



Involvement of reactive oxygen species (ros) in the regulation of antioxidant capacity and proline metabolism in *Arabidopsis Thaliana* under water stress

Kilani Ben Rejeb

► To cite this version:

Kilani Ben Rejeb. Involvement of reactive oxygen species (ros) in the regulation of antioxidant capacity and proline metabolism in *Arabidopsis Thaliana* under water stress. *Vegetal Biology*. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI; Université de Tunis El-Manar. Faculté des Sciences de Tunis (Tunisie), 2015. English. NNT : 2015PA066307 . tel-01330737

HAL Id: tel-01330737

<https://theses.hal.science/tel-01330737>

Submitted on 13 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THÈSE DE DOCTORAT
EN CO-TUTELLE
EN SCIENCES BIOLOGIQUES**

Spécialité : Physiologie Cellulaire et Moléculaire des Plantes

Présentée par

Kilani Ben Rejeb

**Implication des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) dans la
régulation de la capacité antioxydante et du métabolisme de la
proline chez *Arabidopsis thaliana* sous contraintes hydriques**

Soutenue le : **11/06/2015** devant le jury composé de

Monsieur Mokhtar LACHAAL

Professeur, Faculté des Sciences de Tunis

Président

Madame Zeineb OUERGHI ABIDI

Professeur, Faculté des Sciences de Tunis

Rapporteur

Monsieur Alain BOUCHEREAU

Professeur, Université Renne 1, France

Rapporteur

Monsieur Mustapha ROUIS

Directeur de Recherche, INSERM, UPMC, Paris France

Examineur

Monsieur Chedly ABDELLY

Professeur, Centre de Biotechnologie de Botj Cédria

Directeur de Thèse

Monsieur Arnould SAVOURE

Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

Directeur de Thèse

*«Ce n'est pas parce que les choses sont difficiles que nous n'osons pas, mais parce que nous
n'osons pas qu'elles sont difficiles.»*

Sénèque

Dédicace

*À mes parents **Fatteh** et **Baâdia** qui m'ont toujours soutenue et aimée; c'est grâce à vous que je suis arrivée jusqu'à là, soyez fiers de vous.*

*À mon amour et mon épouse **Maâli**, merci pour tout ce que tu m'apporte chaque jour.*

*À mes enfants **Mehdi** et **Rayen** qu'ils trouvent ici le fruit de l'endurance et de la volonté.*

Remerciements

Je voudrais prier toutes les personnes qui m'ont aidé à accomplir ce travail d'accueillir ici tous mes sentiments de gratitude qui viennent du fond de mon cœur, en acceptant mes remerciements.

Mes vifs remerciements s'adressent en premier lieu à mes deux directeurs de thèse, qui m'ont accueilli et dirigé ma recherche et m'ont toujours accordé leur confiance et leur amitié. Leur disponibilité, leur qualité d'écoute, leurs paroles encourageantes et leur compétence m'ont été particulièrement précieuses. Ils m'ont aussi laissé l'autonomie et l'initiative, sans lesquelles je n'aurais pu acquérir la confiance en moi indispensable à l'élaboration de ce travail.

*Je remercie monsieur **Chedly ABDELLY**, Professeur au Centre de Biotechnologie de Borj Cédria et directeur du Laboratoire des Plantes Extrémophiles (LPE) pour m'avoir permis de découvrir le monde de la recherche en m'acceptant en tant que stagiaire lors de ma troisième année de maîtrise et qui a été à l'origine de mon inscription en thèse, et a su élargir le champ de ma formation en me proposant une thèse en co-tutelle avec le Laboratoire d'Adaptation aux Contraintes Environnementales (APCE) de l'UPMC (anciennement Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire des Plantes, PCMP) et je lui en suis reconnaissant. Je le remercie aussi pour ses qualités humaines, pour l'attention qu'il m'a accordée à l'orientation et à la réalisation de mes travaux de recherches.*

*Je remercie monsieur **Arnould SAVOURE**, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie, de m'avoir fait confiance en m'accueillant au sein de son équipe. J'ai grandement apprécié de travailler à ses côtés et je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour tous les conseils qu'il m'a donnés et ses corrections continues. Ses suggestions nombreuses et ses conseils éclairés m'ont été d'un précieux concours pour valoriser les résultats obtenus et à la rédaction des articles. Qu'il trouve ici l'expression de mes remerciements les plus sincères. J'espère pouvoir continuer à collaborer avec lui.*

*Je suis très honoré que monsieur **Mokhtar LACHAAL**, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis, ait voulu accepter de juger ce travail et de présider le jury de soutenance et ce, malgré ses nombreuses préoccupations. Je le remercie vivement.*

*Je suis infiniment gré à madame **Zeineb OUEGHI ABIDI**, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis, de s'être rendu disponible et de m'avoir prodigué maints conseils et d'avoir accepté la fonction de rapporteur.*

De même, je suis particulièrement reconnaissant à monsieur **Alain BOUCHEREAU**, Professeur à l'université de Rennes I, de l'intérêt qu'il a manifesté à l'égard de cette recherche en s'engageant à être rapporteur malgré ses lourdes charges.

Je remercie également monsieur le **Dr Mustapha ROUIS**, directeur de recherches à l'INSERM, Paris 6, d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail.

Mes remerciements vont aussi à monsieur le Professeur **Alain ZACHOWSKI**, directeur de l'Unité de Physiologie Cellulaire et Moléculaire des Plantes à l'UPMC, qui m'a accueilli chaleureusement au sein de son laboratoire.

Je tiens à remercier monsieur **Christophe BAILLY**, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie, de m'avoir accepté dans son laboratoire pour la réalisation de la partie 'capacité antioxydante'. Je le remercie d'avoir mis à ma disposition les outils et les moyens nécessaires au bon déroulement de mes manip. Ses conseils, ses critiques constructives m'ont été très utiles pour mener ce travail.

Une gratitude éternelle à **Delphine Lefebvre-de Vos** et **Isabel Ledisquet** pour l'aide qu'elles m'ont apporté au cours des manipulations, ainsi qu'à leurs agréables compagnies. Merci à Delphine pour m'avoir aidée à prendre mes repères au sein du labo et de m'avoir appris toutes les ficelles des western-blot et de la culture des plantes « in vitro ». Je remercie également Isabel pour m'avoir initié aux techniques de la microscopie électronique et à fluorescence. Un grand merci à vous deux.

Mes vifs remerciements vont également à **Ahmed Debez**, Maître Assistant au Laboratoire des Plantes Extrêmophiles au Centre de Biotechnologie de Borj-Cédria, pour sa grande qualité humaine, son expertise scientifique et sa grande rigueur. Son soutien et ses remarques ont été autant de mains tendues.

Plus personnellement, je remercie ma chère épouse, **Maâli Benzarti**, pour son aide, son écoute et surtout son amour qui m'a été essentiel durant ces années. Je la remercie pour sa compréhension, ses sacrifices et d'avoir supporté avec courage mon absence.

Je remercie tous les membres du LPE et de l'APCE enseignants, chercheurs, techniciens et personnels administratifs avec qui j'ai eu le plaisir de travailler.

Je ne pourrais terminer ces remerciements sans citer ma famille et ma belle famille qui m'ont énormément soutenue durant mes études : **Ommi Ya (Emna)**, **Nana (Dorsaf)**, **Sidi (Karim)**, **Ndowa (Nadia)**, **Nabil**, **Hanen**, **Karim**, **Nousaiba**, **Mehdi**, **Wassim**, **Nadine**, **Azza**, **Amani**, **Amine**, **Nermine** et **Salma**.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. La proline, un acide aminé multifonctionnel impliqué dans l'adaptation des plantes aux contraintes environnementales	5
1.1. Introduction.....	6
1.2. Le métabolisme de la proline chez les plantes.....	6
1.3. Régulation du métabolisme de la proline chez les plantes.....	7
1.4. Accumulation de la proline et tolérance aux contraintes environnementales.....	9
1.5. Rôle de la proline.....	9
1.6. Effet de la proline exogène	10
1.7. Conclusion	11
2. Interconnection entre les espèces réactives de l'oxygène et le métabolisme de la proline	13
2.1. Introduction.....	13
2.2. Proline et espèces réactives de l'oxygène.....	13
2.2.1. Régulation du métabolisme de la proline	13
2.2.2. Les espèces réactives de l'oxygène induit l'accumulation de la proline	15
2.2.3. Biosynthèse de la proline permet de limiter la formation des ERO.....	16
2.2.4. Rôle du catabolisme de la ProDH de la proline dans la génération des ERO par la réduction de l'oxygène	16
2.2.5. Proline : capteur des ERO.....	17
2.2.6. Proline : stimule le système antioxydant	17
2.3. Conclusion	17
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	
1. Matériel végétale	18
2. Conditions de culture des plantes.....	19
2.1. Amplification des lignées d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
2.2. Culture in vitro.....	19
2.3. Culture sur sable.....	20
3. Techniques analytiques	20
3.1. Analyse physiologique	20
3.1.1. Croissance Moyenne Relative (CMR)	20
3.1.2. Teneur Relative en Eau (TRE)	20
3.1.3. Mesure du potentiel osmotique	21

3.1.4. Mesure des échanges gazeux.....	21
3.1.5. Fluorescence chlorophyllienne.....	22
3.1.6. Dosage de la chlorophylle	22
3.1.7. Dosage des ions sodium et potassium	23
3.2. Analyse biochimique	23
3.2.1. Détermination de la proline	23
3.2.2. Estimation de la peroxydation des lipides	24
3.2.3. Détection du peroxyde d'hydrogène par le DAB	24
3.2.4. Détection du peroxyde d'hydrogène par H ₂ DCFH.....	24
3.2.5. Détection du peroxyde d'hydrogène par microscopie électronique à transmission.....	25
3.2.6. Dosage du peroxyde d'hydrogène par spectrophotométrie	25
3.2.7. Extraction des protéines totales	26
3.2.8. Dosage des protéines	26
3.2.9. Mesure d'activités enzymatiques.....	26
3.2.9.1. Activité Superoxyde dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1)	26
3.2.9.2. Activité Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6)	27
3.2.9.3. Activité ascorbate peroxydase (APX) (EC 1.11.1.11)	28
3.2.9.4. Activité Glutathion réductase (GR) (EC 1.6.4.2)	28
3.3. Analyse moléculaire	29
3.3.1. Quantification relative de l'expression des gènes	29
3.3.1.1. Extraction d'ARN totaux	29
3.3.1.2. Synthèse d'ADNc	29
3.3.1.3. RT-PCR semi-quantitative.....	30
3.3.2. Analyse des protéines	30
3.3.2.1. Electrophorèse en conditions dénaturantes.....	30
3.3.2.2. Transfert sur membrane (Western-blot)	30
3.3.2.3. Révélation immunologique	31
CHAPITRE III : CARACTERISATION PHYSIOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DE LA REPONSE AU SEL D'UN MUTANT D'ARABIDOPSIS THALIANA P5CS1-4 DEFICIENT DANS LA SYNTHESE DE LA PROLINE	
1. Introduction.....	32
2. Objectifs	32
3. Méthodologie	32
4. Résultats	33
5. Conclusion	33

6. Article	35
CHAPITRE IV : GENESE DES ESPECES OXYGENEES REACTIVES (ERO) ET IMPLICATION DANS LA REGULATION DE LA CAPACITE ANTIOXYDANTE	
1. Introduction.....	59
2. Objectifs.....	60
3. Méthodologie.....	60
4. Résultats	61
5. Conclusion	62
6. Article	63
CHAPITRE V : IMPLICATION DES ESPECES OXYGENEES REACTIVES (ERO) DANS LA REGULATION DU METABOLISME DE LA PROLINE : ASPECTS BIOCHIMIQUES ET MOLECULAIRES	
1. Introduction.....	72
2. Objectifs.....	72
3. Méthodologie.....	73
4. Résultats	74
5. Conclusion	75
6. Article	76
DISCUSSION GENERALE	101
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	107
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	110

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

Les contraintes abiotiques, particulièrement la sécheresse et la salinité, sont parmi les contraintes environnementales majeures qui limitent la croissance et la productivité des plantes. Ces deux contraintes provoquent un abaissement du potentiel hydrique du sol, avec en plus dans le cas de la salinité, la présence d'ions toxiques pour les plantes. Pour faire face à ces contraintes, les plantes ont mis en place au cours de l'évolution divers mécanismes adaptatifs notamment par l'ajustement de leurs systèmes métaboliques (Verslues *et al.*, 2006). Au niveau cellulaire, la tolérance des plantes au déficit hydrique peut être assurée en partie par l'accumulation de solutés organiques compatibles avec les fonctions cellulaires. Parmi les solutés accumulés, la proline représente l'un des osmolytes les plus fréquemment accumulés chez les plantes pour limiter les effets du stress osmotique. Lors d'une contrainte hydrique, la proline est synthétisée essentiellement à partir du glutamate (Szabados and Saviouré 2010). La chaîne de réactions commence par la réduction du glutamate en pyrroline-5-carboxylate (P5C) par la pyrroline-5-carboxylate synthétase (P5CS). Ce composé est ensuite réduit en proline par la P5C réductase (P5CR). Pendant le stress, la proline est synthétisée dans le cytosol, alors que sa dégradation mitochondriale est contrôlée par la proline déshydrogénase (ProDH). Les concentrations intracellulaires en proline dépendent ainsi d'une régulation fine entre sa biosynthèse et son catabolisme.

Les plantes possèdent des mécanismes de perception et de signalisation complexes leur permettant de traduire les *stimuli* perçus en réponses spécifiques. Par exemple, il a été démontré que le H_2O_2 , la forme la plus stable des espèces réactives de l'oxygène (ERO), a de nombreux rôles essentiels dans la signalisation et le développement des plantes, y compris la mort cellulaire programmée (PCD), l'embryogenèse somatique, la réponse aux blessures, le développement racinaire ou la fermeture des stomates (Fujita *et al.*, 2000). Le H_2O_2 est produit par de nombreux systèmes, y compris les chaînes de transfert d'électrons photosynthétique et respiratoire ainsi que certaines oxydases. Parmi ces dernières, on dénombre les NADPH oxydases localisées au niveau du plasmalemme. Actuellement, il existe des preuves croissantes d'une relation étroite entre les ERO et le métabolisme de la proline, et un certain nombre d'articles ont rapporté un rôle dans l'induction de l'accumulation de la proline. Cependant, jusqu'à présent, des rapports sur les relations entre la production endogène des ERO et l'accumulation de la proline sous contraintes osmotiques sont encore très rares, et nos connaissances sur les mécanismes biochimiques et moléculaires par lesquels le métabolisme de la proline régule la production des ERO sont très limitées, et nécessitent

des recherches plus approfondies. L'objectif principal de ce travail est de contribuer à une meilleure compréhension des interactions entre H_2O_2 et la proline et de vérifier l'hypothèse selon laquelle le H_2O_2 peut agir comme un messenger secondaire dans les voies de signalisation pour réguler le métabolisme de la proline lors d'un stress hyperosmotique chez *Arabidopsis thaliana*.

Les travaux de recherche faisant l'objet de ce mémoire s'inscrivent dans le cadre d'une thèse en cotutelle entre le Laboratoire des Plantes Extrêmophiles (LPE) du Centre de Biotechnologie à la Technopole de Borj-Cédia (CBBC, Tunisie) et le Laboratoire d'Adaptation des Plantes aux Contraintes Environnementales (APCE) à l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC, France).

Le mémoire comprend trois grandes parties suivies d'une conclusion générale et des perspectives qui en découlent :

La première partie correspond à une présentation de la problématique, des méthodes et du modèle. Le chapitre 1 "Données bibliographiques" constitue, tout d'abord, une synthèse bibliographique répartie sur deux parties présentées sous formes de deux articles: une première partie rédigée en français résume l'état des connaissances actuelles sur la régulation du métabolisme de la proline et son importance dans la tolérance des plantes aux contraintes environnementales et une deuxième partie rédigée en anglais traitant l'importance des voies de signalisation médiées par les ERO dans l'adaptation des plantes à leur environnement, et en particulier dans la régulation du métabolisme de la proline. L'impact de la synthèse de la proline sur la génération des ERO est également abordé. Le Chapitre 2 "Matériels et méthodes" expose les principales méthodologies que nous avons utilisées.

La seconde partie: constitue le corps de la thèse. Elle regroupe en trois chapitres l'ensemble des résultats obtenus et leur discussion. Le chapitre 3, "Implication de la proline dans la réponse au sel chez *A. thaliana*" est sous la forme d'un article consacré à la caractérisation physiologique et biochimique de la réponse d'un mutant d'*Arabidopsis thaliana* déficient dans la synthèse de la proline (*p5cs1-4*) en situation d'une contrainte saline prolongée. Il se propose de vérifier également si l'apport exogène de la proline pourrait avoir une fonction protectrice chez ces plantes. Plusieurs paramètres ont été étudiés, y compris l'activité de la croissance des plantes, l'état hydrique des feuilles, l'activité photosynthétique, la sélectivité Na^+ / K^+ , et la capacité antioxydante. Dans le chapitre 4 "Genèse des ERO et implication dans la régulation de la capacité antioxydante" présenté sous la forme d'un article, nous avons

cherché à déterminer par des approches pharmacologiques et de génétique inverse l'importance des NADPH oxydases dans la génération des ERO à un stade précoce de la réponse à une contrainte saline chez *A. thaliana*. D'autre part, l'importance de ces ERO dans la régulation des activités des enzymes antioxydantes a été évaluée. Nous avons étudié la réponse physiologique et biochimique d'un double mutant perte de fonction d'*A. thaliana* (*atrbohD/F*) en situation d'une contrainte saline prolongée. Enfin, dans le chapitre 5 "Implication des ERO dans la régulation du métabolisme de la proline: aspects biochimique et moléculaires" (approches pharmacologiques et de génétique inverse) présenté sous forme d'un article, notre objectif était de déterminer si des connections pouvaient être établies entre la génération précoce des ERO par les NADPH oxydases et la régulation du métabolisme de la proline par ces ERO chez *A. thaliana* en réponse à des contraintes hydriques imposées par le NaCl ou mannitol. Une discussion générale est développée dans une troisième partie.

Ce travail a été soutenu par :

- Le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et des Technologies de l'Information et de la Communication (LR10CBBC02).
- La coopération CNRS/DGRSRT «Aspects physiologiques et moléculaires de la régulation du métabolisme de la proline chez trois brassicacées sous contrainte saline» (réf : 18496).
- La coopération PHC- UTIQUE «Caractérisation physiologique et moléculaire de plantes extrémophiles en vue de leur utilisation comme source de substances bioactives : osmolytes, polyphénols et enzymes antioxydantes» (Comité Mixte de Coopération Universitaire (CMCU), n° 08G0917).
- La coopération PHC- UTIQUE «Régulation du métabolisme de la proline chez *Arabidopsis thaliana*, *Thellungiella salsuginea* et *Cakile maritima* sous contrainte osmotique» (Comité Mixte de Coopération Universitaire (CMCU), n° 29174UF).
- La coopération européenne en science et technologie (COST) «Signaling control of stress tolerance and production of stress protective compounds in plants», code FA0605.
- La coopération européenne en science et technologie (COST) «Putting Halophytes to Work - From Genes to Ecosystems», code FA0901.

Chapitre I/ Synthèse bibliographique (Article 1):

**LA PROLINE, UN ACIDE AMINÉ
MULTIFONCTIONNEL IMPLIQUÉ DANS
L'ADAPTATION DES PLANTES AUX
CONTRAINTES ENVIRONNEMENTALES**

CHAPITRE I :

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

(Partie 1)

PRÉFACE

La proline est un acide aminé essentiel pour la synthèse protéique et le métabolisme primaire chez les êtres vivants. Des données récentes suggèrent que cet acide aminé joue d'autres rôles, non encore totalement élucidés, tels que la stabilisation des protéines, le piégeage des radicaux libres, la régulation du potentiel redox cellulaire, la signalisation cellulaire et la tolérance aux contraintes hydriques. L'accumulation de la proline résulte d'une activation de sa biosynthèse localisée à la fois dans le cytoplasme et dans le chloroplaste chez les plantes et de la répression de son catabolisme dans la mitochondrie. Dans cette première partie de la synthèse bibliographique, nous résumons l'état des connaissances actuelles sur la régulation du métabolisme de la proline et son importance dans la tolérance des plantes aux contraintes environnementales.

Biologie Aujourd'hui, 206 (4), 291-299 (2012)
© Société de Biologie, 2013
DOI: [10.1051/jbio/2012030](https://doi.org/10.1051/jbio/2012030)

La proline, un acide aminé multifonctionnel impliqué dans l'adaptation des plantes aux contraintes environnementales

Kilani Ben Rejeb^{1,2}, Chedly Abdelly² et Arnould Savouré¹

¹ Physiologie Cellulaire et Moléculaire des Plantes, UR5, EAC 7180 CNRS, Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Case 156, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France

² Laboratoire des Plantes Extrémophiles, Centre de Biotechnologie de Borj-Cedria (CBBC), BP 901, 2050 Hammam-Lif, Tunisie

Auteur correspondant : Arnould Savouré, arnould.savoure@upmc.fr

Reçu le 9 octobre 2012

Résumé – Outre son rôle dans le métabolisme primaire en tant que constituant des protéines, la proline est l'un des solutés compatibles le plus fréquemment accumulé en réponse à des contraintes environnementales variées et joue un rôle important dans la tolérance des plantes. La proline a été proposée comme stabilisateur de protéines et de complexes macromoléculaires, piègeur de radicaux libres et régulateur du potentiel redox cellulaire. La concentration intracellulaire de la proline dépend d'une régulation fine entre sa biosynthèse et sa dégradation. Cependant le rôle exact de la proline et les voies de signalisation impliquées dans la régulation de son métabolisme ne sont pas encore complètement élucidés. L'étude du métabolisme de la proline chez les plantes modèles permettrait d'acquérir des informations quant aux mécanismes différentiels mis en œuvre par les plantes pour faire face aux contraintes environnementales et d'établir des outils pertinents pouvant être utilisés dans l'amélioration des plantes cultivées.

Mots clés : Contraintes environnementales / plantes / métabolisme de la proline / adaptation des plantes / signalisation cellulaire

Abstract – Proline, a multifunctional amino-acid involved in plant adaptation to environmental constraints.

In addition to its role in primary metabolism as a component of proteins, proline is one of the most widely distributed compatible solutes that accumulates in plants during adverse environmental constraints and plays an important role in plant stress tolerance. Proline was proposed to act as stabilizer for proteins and macromolecular complexes, scavenger of free radicals and regulator of cellular redox potential. Intracellular proline concentration depends on a tight regulation between its biosynthesis and catabolism. However the exact role of proline and the signaling pathways involved in the regulation of its metabolism are not completely known yet. Investigation of proline metabolism in model plants would allow to acquire information about the diversity of the mechanisms developed by plants to overcome environmental constraints and to establish some reliable tools for the improvement of crop tolerance.

Key words: Environmental constraints / plant / proline metabolism / plant adaptation / plant signalling

Abréviations

ABA :	Acide Abscissique
ABRE :	<i>ABA Responsive Element</i>
bZIP :	<i>basic Leucine Zipper Protein</i>
ERO :	Espèces Réactives de l'Oxygène
GFP :	<i>Green Fluorescent Protein</i>
NADPH :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide PHosphate
nat-siARN :	<i>natural antisense-small interfering RNA</i>
$^1\text{O}_2$:	oxygène singulet
OH $^\cdot$:	radical hydroxyle
P5C :	Pyroline-5-Carboxylate
P5CDH :	P5C DésHydrogénase
P5CR :	P5C Réductase
P5CS :	P5C Synthétase
PLCs :	PhosphoLipases C
PLDs :	PhosphoLipases D
PRE :	<i>Proline-Responsive-Element</i>
ProDH :	Proline DésHydrogénase
R2NO :	Radical proline-NitrOxyl
RH :	Réponse Hypersensible
SA :	Acide Salicylique
SOD :	SuperOxide Dismutase
SRO5 :	<i>Similar to Radical induced cell death One 5</i>
δ OAT :	Ornithine Delta-AminoTransférase

Introduction

Les contraintes abiotiques, particulièrement la sécheresse et la salinité, sont celles qui sont les plus impliquées dans la limitation de la croissance des plantes et la productivité des cultures. Ces deux contraintes conduisent à un abaissement du potentiel hydrique du sol, avec en plus, dans le cas de la salinité, une accumulation d'ions toxiques pour les plantes. Pour faire face à ces contraintes, les plantes ont mis en place au cours de l'évolution divers mécanismes adaptatifs leur permettant notamment d'ajuster leur potentiel hydrique (Verslues *et al.*, 2006). Au niveau cellulaire, la tolérance des plantes au déficit hydrique implique notamment l'accumulation de solutés organiques dit compatibles car ils n'interfèrent pas avec les fonctions cellulaires. La proline est classée parmi les osmolytes les plus fréquemment accumulés chez un grand nombre d'espèces. Cependant, son accumulation chez les plantes peut aussi être le résultat d'autres facteurs environnementaux qui ne perturbent pas la balance osmotique tels que les contraintes biotiques. Il est aujourd'hui bien admis que la proline, outre sa contribution dans l'ajustement osmotique, a d'autres rôles (figure 1)

(Szabados & Savouré, 2010). La proline peut stabiliser les membranes et les complexes protéiques. Elle peut agir comme antioxydant, notamment grâce à sa capacité de piégeage des radicaux libres. Elle peut également intervenir dans la régulation du pH cytoplasmique ou servir de réserves carbonées et azotées que la plante utilisera postérieurement à la période du stress (Verslues & Sharma, 2010). Selon des données récentes, l'effet protecteur de la proline en condition de stress serait la conséquence des changements dans la régulation de son métabolisme et de ses propriétés intrinsèques. La biosynthèse et la dégradation de la proline sont impliquées dans la régulation du potentiel redox intracellulaire, le stockage d'énergie et son transfert (Sharma *et al.*, 2011). Cette revue résume l'état des connaissances actuelles sur la régulation du métabolisme de la proline et son importance dans la tolérance des plantes aux contraintes environnementales.

Le métabolisme de la proline
chez les plantes

Chez les plantes, la proline est synthétisée essentiellement à partir du glutamate (figure 1). Ce composé est d'abord phosphorylé puis réduit en pyroline-5-carboxylate (P5C) par la pyroline-5-carboxylate synthétase (P5CS). Le P5C est ensuite réduit en proline par la P5C réductase (P5CR). Lors d'un déficit hydrique, la proline est synthétisée dans le cytosol et les chloroplastes. Le catabolisme de cet acide aminé est localisé dans les mitochondries par l'action séquentielle de la proline déshydrogénase (ProDH) et la P5C déshydrogénase (P5CDH). Chez *Arabidopsis thaliana*, ils existent deux isoformes de P5CS codées par les gènes *P5CS1* et *P5CS2*, alors qu'un seul gène code pour la P5CR. Chez *A. thaliana*, deux gènes *ProDH1* et *ProDH2* codent pour deux isoformes de ProDH et un seul pour la P5CDH. En utilisant des plantes transformées exprimant *P5CS1* fusionnée avec la GFP et des mutants nuls pour chacun des deux gènes *P5CS1* et *P5CS2*, Szekely *et al.* (2008) ont démontré qu'en condition normale la protéine *P5CS1*-GFP est localisée dans le cytosol, et que les contraintes osmotiques stimulent l'import de la protéine *P5CS1*-GFP dans les chloroplastes. En revanche, *P5CS2*-GFP se trouve localisée dans le cytosol.

La compartimentation du métabolisme de la proline implique un transport intracellulaire de la proline entre le cytosol, les chloroplastes et les mitochondries. Des systèmes de transport de type uniport ou antiport assurant respectivement le transport de la proline ou son échange avec le glutamate ont été mis en évidence dans les mitochondries de blé (Di Martino *et al.*, 2006).

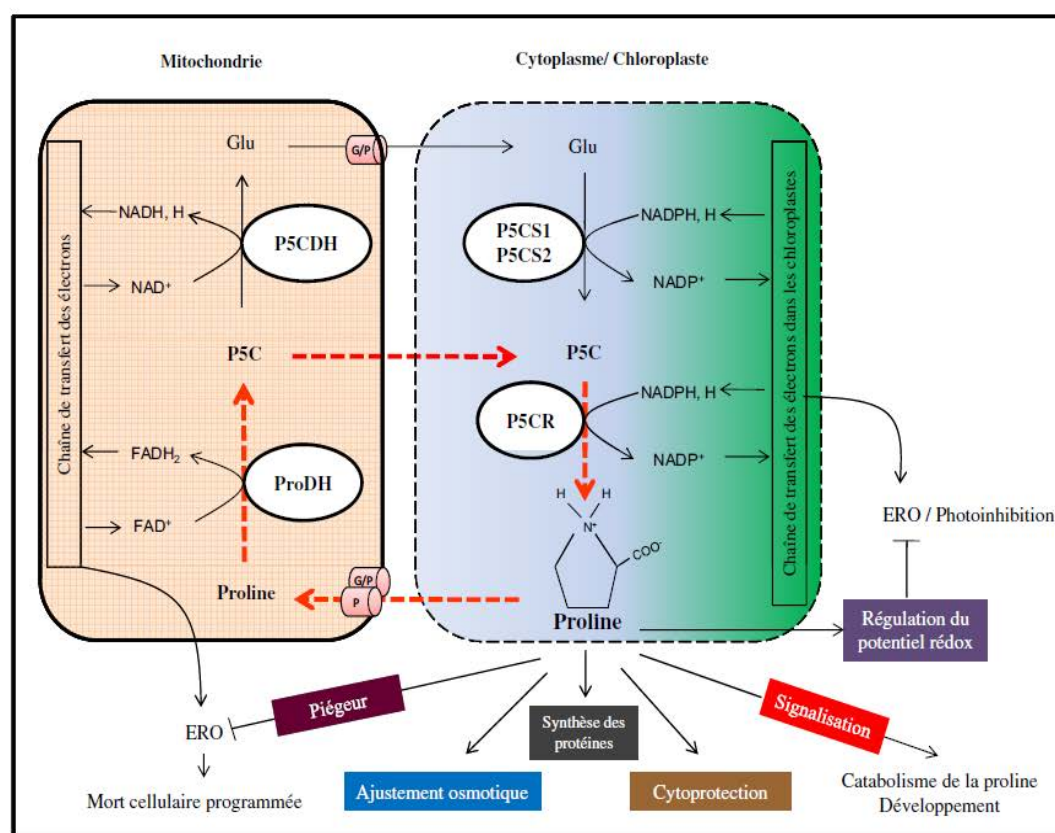


Fig. 1. Métabolisme de la proline et ses fonctions cellulaires. Le cycle P5C/proline est marqué par des flèches en pointillé, le P5C mitochondrial peut être recyclé en proline dans le cytoplasme par la P5CR sans produire du glutamate. Abréviations : ERO, espèces réactives de l'oxygène; FAD, Flavine Adénine Dinucléotide; G/P, Antiport Glutamate/Proline; Glu, Glutamate; NADP, Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate; P, Uniport Proline; P5C, Pyrroline-5-Carboxylate; P5CDH, P5C DésHydrogénase; P5CR, P5C Réductase; P5CS, P5C Synthétase; ProDH, Proline DésHydrogénase.

Cependant, les gènes codant pour ces transporteurs n'ont pas encore été identifiés.

Régulation du métabolisme de la proline chez les plantes

Les concentrations intracellulaires en proline dépendent d'une régulation fine entre sa biosynthèse et son catabolisme. Les deux étapes limitantes du métabolisme de la proline se situent au niveau de sa biosynthèse, catalysée par la P5CS, et à celui de son catabolisme, catalysé par la ProDH. L'expression du gène *P5CS* et la répression simultanée du gène *ProDH* conduisent à une accumulation de la proline pendant le déficit hydrique, tandis que la réhydratation provoque une régulation opposée

(Peng *et al.*, 1996). Bien que les voies de signalisation impliquées dans la régulation du métabolisme de la proline ne soient pas encore complètement établies, les informations actuelles permettent de s'en faire une idée globale (figure 2). *P5CS1* est régulée à la fois au niveau de sa transcription et de son activité qui peut être rétro-inhibée par la proline (Zhang *et al.*, 1995). L'expression de *P5CS1* est stimulée par la lumière (Hayashi *et al.*, 2000) ainsi que par le monoxyde d'azote (Zhao *et al.*, 2009) et réprimée par l'application de brassinostéroïdes (Abraham *et al.*, 2003). L'expression d'*AtP5CS1* en réponse à une contrainte hyperosmotique peut être induite par l'acide abscissique (ABA) à travers un élément *cis*, appelé *ABA Responsive Element* (ABRE) présent dans le promoteur du gène *P5CS1* (Strizhov *et al.*, 1997). Toutefois, l'expression de ce gène n'est pas

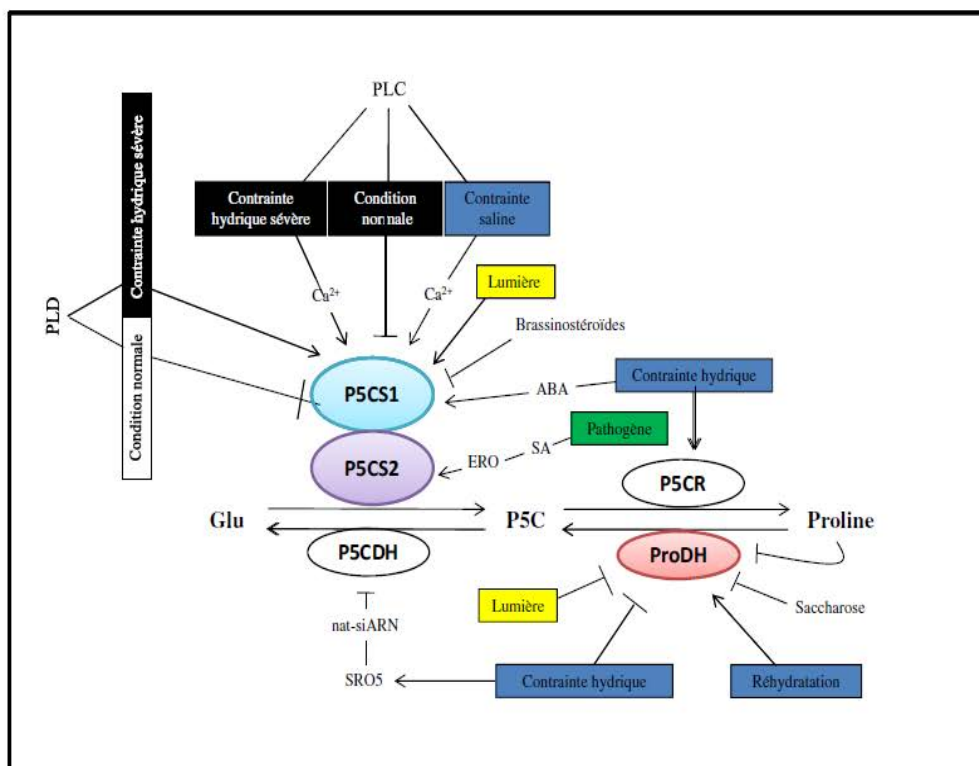


Fig. 2. Voies de signalisation impliquées dans la régulation du métabolisme de la proline. Ces voies ont été principalement caractérisées chez *Arabidopsis thaliana*. Les boîtes noires correspondent aux voies de signalisation récemment mises en évidence chez *Thellungiella salsuginea*, espèce modèle des halophytes. Les deux étapes limitantes du métabolisme de la proline se situent au niveau de sa biosynthèse catalysée par la P5CS et au niveau de son catabolisme catalysé par la ProDH. Abréviations : ABA, Acide Abscisique ; ERO, Espèces Réactives de l'Oxygène ; Glu, Glutamate ; nat-siARN, *natural antisense-small Interfering RNA* ; δ OAT : Ornithine Delta-AminoTransférase ; P5C, Pyrroline-5-Carboxylate ; P5CS, P5C Synthétase ; PLC, PhosphoLipase C ; PLD, PhosphoLipase D ; ProDH, Proline DésHydrogénase. SA, Acide Salicylique ; SRO5, *Similar to Radical induced cell death One 5*.

toujours dépendante de l'ABA. En effet, Savouré *et al.* (1997) ont montré que l'induction de *P5CS1* se produit indépendamment de l'ABA. Cela a été confirmé récemment par Sharma & Verslues (2010) qui ont rapporté une expression ABA-indépendante d'*AtP5CS1*. Il a été également démontré que les phospholipases D (PLDs) sont des régulateurs négatifs du métabolisme de la proline en absence de contraintes chez *A. thaliana* (Thiery *et al.*, 2004) tandis que les PLCs, *via* la signalisation calcique, régulent positivement la biosynthèse de la proline lors d'une contrainte saline (Parre *et al.*, 2007). Récemment, Ghars *et al.* (2008a, 2012) ont mis en évidence l'implication de ces mêmes acteurs signalétiques PLCs et PLDs dans la régulation du métabolisme de la proline chez *Thellungiella salsuginea*, anciennement appelée *T. halophila*. Fait particulièrement intéressant, ces mêmes acteurs participent à la régulation du métabolisme de la proline chez cette halophyte de manière opposée par rapport à *Arabidopsis*. Les PLDs régulent

positivement la voie de biosynthèse de la proline en présence du stress alors que les PLCs exercent un contrôle négatif en absence ou en présence d'une contrainte saline modérée (200 mM NaCl) et un contrôle positif en présence d'une contrainte hyperosmotique (400 mM mannitol) ou d'une contrainte saline sévère (400 mM NaCl). Ce schéma de régulation démontre que les plantes natives des biotopes salins (halophytes) mettent en œuvre des voies de régulation et de signalisation différentes de celles observées chez les glycophytes.

Contrairement à *P5CS1*, l'expression de *P5CS2* semble peu régulée par les contraintes abiotiques. En revanche, les contraintes biotiques induisent l'accumulation des transcrits *P5CS2*. En réponse à l'attaque d'un pathogène, il a été démontré que chez *A. thaliana*, l'activation du gène *P5CS2* et la synthèse de proline sont régulées positivement par l'acide salicylique (SA) impliquant les espèces réactives de l'oxygène (ERO) comme signal intermédiaire

(Fabro *et al.*, 2004). *P5CS2* s'exprime également dans les cellules en division dans les *primordia* foliaires et les méristèmes (Szekely *et al.*, 2008).

En condition de déficit hydrique, l'expression de *ProDH* est inhibée. Lors de la réhydratation de la plante ou après un traitement par la proline, le catabolisme de cet acide aminé et en particulier l'expression de *ProDH* sont induits (Servet *et al.*, 2012). L'analyse du promoteur de *ProDH* et son induction par la proline ont conduit à l'identification d'un élément *cis* ACTCAT appelé *Proline-Response-Element* (PRE) (Satoh *et al.*, 2002). Cet élément est reconnu par des facteurs de transcription de type bZIP (*Basic Leucine Zipper Protein*), en particulier AtbZIP11 et AtbZIP53 (Satoh *et al.*, 2004). L'expression ectopique de bZIP11 chez *Arabidopsis* induit l'expression de *ProDH1* et *ProDH2* conduisant à la diminution des niveaux de proline (Hanson *et al.*, 2008). Hayashi *et al.* (2000) ont montré que chez *A. thaliana* les niveaux de proline et des transcrits *P5CS* et *ProDH* sont dépendants de la photopériode. À l'inverse de *P5CS1*, l'expression de *ProDH1* est inhibée par la lumière et induite par l'obscurité. En analysant le métabolisme de la proline à un stade précoce de la réponse hypersensible (RH) contre l'attaque par un agent pathogène chez *A. thaliana*, Cecchini *et al.* (2011) ont montré que l'activité *ProDH* est nécessaire au développement de la RH. L'induction de l'expression *ProDH1* est dépendante du SA.

Chez *A. thaliana*, Borsani *et al.* (2005) ont montré qu'en condition normale, le gène *P5CDH* est constitutivement exprimé. En condition de contrainte saline, le gène *SRO5* (dont la fonction n'est pas connue) est transcrit sur l'autre brin d'ADN du même locus pour donner un ARN partiellement complémentaire à *P5CDH*. L'hybridation des deux transcrits codants forme un ARN double brin qui est clivé pour produire un duplex nat-siARN (*natural antisense-small interfering RNA*). Ces nat-siARN vont cliver les transcrits *P5CDH* entraînant la diminution des niveaux des transcrits *P5CDH*. Cette régulation permet de réduire la dégradation de la proline afin de mieux répondre à la contrainte saline.

Accumulation de la proline et tolérance aux contraintes environnementales

L'accumulation de la proline est l'une des stratégies adaptatives fréquemment observées chez un grand nombre d'espèces en réponse à des contraintes environnementales variées. Une corrélation positive entre cette accumulation et la tolérance à des contraintes hydriques a été rapportée dans de nombreux systèmes biologiques. Certaines halophytes comme *Sesuvium portulacastrum* (Slama *et al.*, 2006) et *Cakile maritima*

(Megdiche *et al.*, 2009) accumulent la proline à des niveaux particulièrement élevés. Ce comportement est concomitant d'une capacité d'osmorégulation quand ces halophytes sont soumises au sel et/ou à un déficit hydrique. *T. salsuginea* accumule la proline d'une manière constitutive. Sa grande aptitude à tolérer le sel (survie à plus de 500 mM NaCl) est corrélée à une hyperaccumulation de la proline, résultant d'une augmentation des niveaux de transcrits *P5CS* et d'une diminution de ceux de *ProDH* (Kant *et al.*, 2006). Bien que des différences inter- et intraspécifiques d'accumulation de la proline aient été mises en évidence chez les plantes et que la capacité d'hyperaccumulation de la proline accompagne le caractère de tolérance chez plusieurs plantes, certaines données suggèrent que l'accumulation de la proline est plutôt un symptôme de sensibilité. Les données acquises particulièrement sur le comportement de certains mutants plaident en faveur de cette hypothèse. Dans ce cadre, Liu & Zhu (1997) ont montré que le mutant *sos1* affecté dans un antiport Na^+/H^+ est hypersensible à la présence de NaCl alors qu'il montre des teneurs en proline deux fois plus élevées que celles mesurées chez le sauvage. Le mutant *eskimo1*, qui suraccumule également la proline est moins tolérant au déficit hydrique et à la salinité que le sauvage (Ghars *et al.*, 2008b). Le mutant *p5cs1* d'*Arabidopsis* produit cinq fois moins de proline que le sauvage et présente une hypersensibilité à la présence de sel. L'ensemble de ces données suggère que le rôle de la proline dans l'osmotolérance est étroitement lié à l'espèce étudiée et que son accumulation ne confère pas toujours une adaptation à des conditions environnementales extrêmes, ce qui ouvre le débat sur le rôle exact de la proline.

Rôles de la proline

De nombreuses études ont montré que la proline protège les plantes contre les contraintes environnementales en stabilisant la structure et les fonctions des macromolécules et des organites (Hare *et al.*, 1998). Il a été démontré que la proline peut fonctionner comme une molécule chaperonne capable de protéger l'intégrité des protéines et d'améliorer l'activité de certaines enzymes. Il a été proposé que la nature amphiphile de la proline lui permet de créer des liaisons hydrogène avec des molécules d'eau ou des macromolécules. Le noyau pyrrolidine forme une structure plane et hydrophobe alors que l'extrémité carboxyle constitue une partie hydrophile. Ainsi, l'accumulation de la proline pendant une contrainte hydrique permettrait de créer une sphère d'hydratation autour de la protéine, lui évitant ainsi d'être dénaturée (Schobert & Tschesche, 1978; Chadalavada, 1994). Il a été montré que la proline contribue à la conservation et à la stabilisation des enzymes et/ou des

protéines comme la RuBisCo (Solomon *et al.*, 1994) et le complexe II de la chaîne mitochondriale de transfert d'électrons (Hamilton & Heckathorn, 2001). Mishra & Dubey (2006) ont également montré un effet protecteur de la proline sur des ribonucléases et des protéases *in vitro* en présence d'arsenic.

La proline peut avoir aussi un rôle dans la détoxification des ERO. L'effet protecteur de la proline contre le radical hydroxyle (OH^\cdot) a été rapporté par Smirnoff & Cumbes (1989). Floyd & Nagi (1984) ont montré qu'un radical proline-nitroxyl (R_2NO) peut être formé entre la proline et OH^\cdot . De plus la proline est capable de « quencher » efficacement *in vitro* l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) (Alia *et al.*, 2001). Hua & Guo (2002) ont montré que l'application exogène de proline améliore l'activité de la superoxyde dismutase dans les cals de soja en condition de contrainte saline. Une corrélation négative entre la peroxydation des lipides et l'accumulation de la proline a été observée chez la canne à sucre sur-exprimant le gène *P5CS1* provenant de *Vigna aconitifolia*, suggérant que l'accumulation de la proline pourrait agir en tant que composante du système de défense anti-oxydant et atténuer les effets délétères du stress oxydatif induit par les contraintes osmotiques. Dans le même contexte, la transformation de *Petunia hybrida* par *AtP5CS1* ou *OsP5CS* lui confère une plus grande capacité d'accumulation de la proline et une meilleure tolérance au déficit hydrique (Yamada *et al.*, 2005). Le mutant *p5cs1* affecté dans son accumulation de proline montre une réduction de l'activité anti-oxydante des enzymes clés du cycle ascorbate-gluthathion, conduisant à une hyper-accumulation des ERO et à une intensification des dommages oxydatifs (Szekely *et al.*, 2008). La proline jouerait donc le rôle d'une molécule anti-oxydante et/ou stabiliserait l'activité des enzymes impliquées dans la défense contre le stress oxydatif.

Le cycle P5C/proline découvert récemment chez les plantes (Miller *et al.*, 2009; Cecchini *et al.*, 2011) peut fournir des électrons à la chaîne de transfert des électrons des mitochondries sans produire du glutamate et, sous certaines conditions, peut générer des ERO dans la mitochondrie (figure 1). Par conséquent, le catabolisme de la proline joue un rôle important dans la régulation des niveaux cellulaires en ERO et peut influencer de nombreuses autres voies régulatrices. En effet, le métabolisme de la proline peut influencer la mort cellulaire programmée chez les plantes. Chez *Arabidopsis*, l'interaction incompatible plante-pathogène déclenche, par l'intermédiaire des ERO, une RH qui est accompagnée par une activation locale de *P5CS2* et une accumulation de la proline (Fabro *et al.*, 2004). Dans ces cellules, la proline peut augmenter l'accumulation des transcrits *ProDH* et entraîner une accumulation de P5C qui, en combinaison avec les ERO, peut fonctionner comme un signal

apoptotique déclenchant une RH lors d'une infection par des agents pathogènes avirulents (Fabro *et al.*, 2004). Dans les mitochondries, l'activité de l'ornithine delta-aminotransférase (δOAT) permet également de générer du P5C directement (Funck *et al.*, 2008). Senthil-Kumar & Mysore (2012) ont démontré que la régulation coordonnée de *ProDH1* et δOAT joue un rôle important dans la mise en place de mécanismes de défense contre l'infection par des agents pathogènes grâce à une régulation fine du métabolisme du P5C et la production des ERO. Dans ces interactions plantes-pathogènes, la P5CDH à travers l'oxydation du P5C régule également le cycle P5C/proline pour contrôler la production des ERO.

Outre son rôle protecteur, certaines études suggèrent que le métabolisme de la proline peut réguler l'homéostasie cellulaire dans des conditions de stress. Lors d'un déficit hydrique, la fermeture des stomates réduit la disponibilité de CO_2 , ce qui conduit à une réduction de l'activité du cycle de Calvin et, par conséquent, à une diminution de la consommation du pouvoir réducteur NAD(P)H/H^+ . L'activation de la biosynthèse de proline dans les chloroplastes permettrait d'atténuer ce phénomène. La synthèse de la proline à partir du glutamate nécessite l'oxydation de deux NAD(P)H^+ en NAD(P)^+ . En régénérant l'accepteur final de la chaîne de transfert des électrons dans l'appareil photosynthétique, la biosynthèse de la proline permet ainsi de réduire la production des ERO et de participer à la protection contre la photo-inhibition en condition de contraintes (Hare *et al.*, 1998). La biosynthèse de la proline maintient le rapport $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ compatible avec le métabolisme cellulaire. La dégradation de la proline dans les mitochondries est directement couplée au transport d'électrons et à la synthèse d'ATP au niveau de la chaîne respiratoire. Après la levée de la contrainte, la dégradation de la proline par la *ProDH* et *P5CDH* fournit du pouvoir réducteur dans la mitochondrie. Les électrons provenant de l'oxydation de la proline vont être transférés à un accepteur de la chaîne respiratoire et donc contribuer à l'approvisionnement énergétique pour la reprise de la croissance (Kavi-Kishor *et al.*, 1995).

Effet de la proline exogène

Les effets bénéfiques de l'apport exogène de proline sur la tolérance des plantes aux contraintes abiotiques telles que les métaux lourds, la température, la sécheresse et la salinité ont été bien documentés (Ali *et al.*, 2007, 2008; Hayat *et al.*, 2012). Ces auteurs ont rapporté que la pulvérisation foliaire de proline améliore le statut nutritionnel et la croissance du maïs soumis à un déficit hydrique. L'apport exogène de proline contribue à un abaissement

significatif du potentiel hydrique des feuilles de *Vicia faba* au cours d'une contrainte saline (Gadallah *et al.*, 1999), améliorant ainsi son alimentation hydrique. La proline exogène rétablit l'activité photosynthétique et les relations hydriques des feuilles d'*Olea europaea* L. cv Chemlali en conditions de contrainte saline (Ben Ahmed *et al.*, 2010). Selon Sharma *et al.* (1998), la proline exogène protège *in vitro* l'activité enzymatique de la nitrate réductase et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase vis-à-vis des métaux lourds tels que le cadmium ou le zinc.

Outre les effets bénéfiques de son application exogène chez les plantes, la proline peut provoquer des effets toxiques lorsqu'elle est suraccumulée ou appliquée à des concentrations excessives. Une concentration supérieure à 10 mM est toxique pour *Arabidopsis*. Les symptômes causés par la proline incluent des altérations de l'ultrastructure des chloroplastes et des mitochondries ainsi que plusieurs aspects de la mort cellulaire programmée (Hare *et al.*, 2001; Deuschle *et al.*, 2004). Dans le modèle proposé par Chen *et al.* (2011), la proline exogène est capable d'induire la génération des ERO par les NADPH oxydases, qui par la suite induisent la production de SA, conduisant à l'apparition des symptômes de toxicité rappelant ceux observés lors de la RH. L'effet toxique de la proline serait attribué au fait qu'une concentration élevée en proline active le cycle P5C/proline (Cecchini *et al.*, 2011). L'hyperactivation de ce cycle induit une genèse accrue des électrons à partir de l'oxydation incomplète de la proline pouvant dépasser les potentialités de transfert de la chaîne mitochondriale, ce qui a pour conséquence une augmentation du transfert des électrons à l'O₂ et conduit à la formation des ERO (Miller *et al.* 2009).

des mécanismes mis en œuvre par les plantes pour s'adapter, en vue d'établir et de proposer de nouveaux outils ou stratégies expérimentales susceptibles d'améliorer la tolérance des plantes aux contraintes de l'environnement.

Remerciements. K. Ben Rejeb a bénéficié d'une bourse de doctorat du Ministère Tunisien de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (LR10CBBC02) et du programme Franco-Tunisien CMCU (Comité Mixte de Coopération Universitaire) n°08G0917. Une partie de cette étude a été également soutenue par les programmes COST FA0605 et COST FA0901.

Conclusions

L'accumulation de la proline est l'une des stratégies adaptatives fréquemment observées chez les plantes en réponse à diverses contraintes environnementales. Le rôle attribué à la proline dans la réponse des plantes à ces contraintes demeure encore controversé. En dépit des nombreuses études conduites sur la proline, son rôle et les voies de signalisation impliquées dans la régulation de son métabolisme ne sont pas encore bien établis. Nos connaissances sont encore largement insuffisantes, notamment au niveau de la régulation du catabolisme de cet acide aminé et de son rôle dans l'adaptation des plantes aux contraintes environnementales et plus largement chez les eucaryotes dans la régulation de l'homéostasie cellulaire. L'étude de ce métabolisme chez des espèces se développant dans des environnements extrêmes serait une approche pertinente pour analyser la diversité

Chapitre I/ Synthèse bibliographique (Article 2) :
INTERCONNEXION ENTRE LES ESPÈCES
RÉACTIVES DE L'OXYGÈNE ET LE
MÉTABOLISME DE LA PROLINE EN
REPONSE AUX CONTRAINTES
ENVIRONNEMENTALES

CHAPITRE I :

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

(Partie 2)

PRÉFACE

Les plantes soumises à des contraintes environnementales produisent des espèces réactives d'oxygène (ERO). Ces ERO ont été longtemps considérées comme des molécules extrêmement réactives et très délétères pour le métabolisme cellulaire. Récemment il est apparu que ces molécules avaient un rôle dans la transmission de signaux intracellulaires. Le métabolisme de la proline est particulièrement intéressant à étudier dans ce contexte car la biosynthèse et le catabolisme de cet acide aminé permettent de réguler le potentiel redox des cellules. Des données récentes ont montré que ces molécules sont interconnectées en réponse à des contraintes biotiques. Dans cette deuxième partie de la synthèse bibliographique, nous nous sommes intéressés essentiellement à analyser selon les données bibliographiques disponibles l'importance des voies de signalisation médiées par les ERO dans l'adaptation des plantes à leur environnement, et en particulier dans la régulation du métabolisme de la proline. L'impact de l'accumulation de la proline sur la génération des ERO a été également analysé.



Contents lists available at ScienceDirect

Plant Physiology and Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/plaphy

Review

How reactive oxygen species and proline face stress together

Kilani Ben Rejeb^{a,b}, Chedly Abdelly^b, Arnould Savouré^{a,*}^a Université Pierre & Marie Curie (UPMC), Univ. Paris 6, APCE, URF5, Case 156, 4 place Jussieu, 75252 Paris cedex 05, France^b Laboratoire des Plantes Extrémophiles, Centre de Biotechnologie de Borj-Cedria (CBBC), BP 901, Hammam-Lif 2050, Tunisia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 January 2014

Accepted 9 April 2014

Available online 23 April 2014

Keywords:

Abiotic stress tolerance

Proline metabolism

Redox homeostasis

Reactive oxygen species (ROS)

ROS signalling

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are continuously generated as a consequence of plant metabolic processes due to incomplete reduction of O₂. Previously considered to be only toxic by-products of metabolism, ROS are now known to act as second messengers in intracellular signalling cascades to trigger tolerance of various abiotic and biotic stresses. The accumulation of proline is frequently observed during the exposure of plants to adverse environmental conditions. Interestingly proline metabolism may also contribute to ROS formation in mitochondria, which play notably a role in hypersensitive response in plants, life-span extension in worms and tumor suppression in animals. Here we review current knowledge about the regulation of proline metabolism in response to environmental constraints and highlight the key role of ROS in the regulation of this metabolism. The impact of proline on ROS generation is also investigated. Deciphering and integrating these relationships at the whole plant level will bring new perspectives on how plants adapt to environmental stresses.

© 2014 Published by Elsevier Masson SAS.

1. Introduction

Growing in their native environments plants encounter a variety of biotic and abiotic constraints (Atkinson and Urwin, 2012). Plants commonly accumulate reactive oxygen species (ROS) in response to environmental stresses. The excessive production of ROS in plant cells is potentially harmful to nucleic acids, proteins and lipids, which can lead to cell injury and death (Gill and Tuteja, 2010). To survive such constraints, plants have a variety of mechanisms that allow them to perceive and transduce the external signals in order to trigger adaptive responses and it has become apparent that ROS are important signal molecules involved in the stress responses (Miller et al., 2011).

In many plants, free proline accumulates in response to a wide range of biotic and abiotic stresses. Today it is clear that proline has multifunctional roles (for review, see Szabados and Savouré, 2010). Other than being an osmoprotectant, proline can act as a potent nonenzymatic antioxidant. As a singlet oxygen quencher (Alia et al., 2001) and scavenger of hydroxyl radicals (Smirnov and Cumbes, 1989), when it accumulates in plant tissue proline may be important in preventing oxidative damage caused by ROS. Proline may stabilize DNA, membranes and protein complexes, and provide a

source of carbon and nitrogen for growth after stress relief. Proline metabolism is involved in the regulation of intracellular redox potential and the storage and transfer of energy and reducing power (Szabados and Savouré, 2010; Sharma et al., 2011; Gilberti et al., 2014). Changes in proline metabolism may be more beneficial for plant tolerance to environmental stresses than properties of the amino acid itself.

Although the harmful effects and the signalling functions of ROS are well documented, readers are referred to recently published excellent reviews (Petrov and Van Breseghem, 2012; Miller et al., 2011; Suzuki et al., 2012), only limited knowledge is available on the relationship between ROS and proline metabolism.

In this paper, we reviewed the relationship between ROS signalling and proline metabolism in the context of plant adaptation to adverse environments with a special emphasis on how proline metabolism is regulated by these compounds. The impact of proline synthesis on ROS generation is also addressed.

2. Proline and ROS

2.1. Regulation of proline metabolism

Free proline accumulates in plants in response to a wide range of abiotic and biotic stresses. Plant stress has been defined by Lichtenthaler (1996) as any unfavorable environmental conditions that alter plant growth, development and metabolism, and even may lead to plant death. Salt and soil drought conditions are major

* Corresponding author. Tel.: +33 (0)1 44 27 26 72; fax: +33 (0)1 44 27 61 51.
E-mail address: arnould.savouré@upmc.fr (A. Savouré).

abiotic stress factors that limits crop productivity (Lawlor, 2002). Most of the data on the regulation of proline metabolism have been obtained from plants grown under salt and osmotic stress conditions.

Proline accumulation upon stress depends on both activation of its biosynthesis and inhibition of its degradation (Fig. 1). House-keeping proline biosynthesis occurs in the cytosol of plant cells, but it is possible that production moves to chloroplasts upon stress (Székely et al., 2008). Under osmotic stress, proline is synthesized mainly from glutamate (Fig. 2). In this pathway, the bifunctional pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) reduces glutamate to glutamyl-5-semialdehyde (GSA), which is spontaneously converted to pyrroline-5-carboxylate (P5C). P5C is reduced to proline by P5C reductase (P5CR). Degradation of proline takes place in mitochondria via the sequential action of proline dehydrogenase (ProDH) and P5C dehydrogenase. The rate-limiting steps in proline biosynthesis and degradation in *Arabidopsis* are catalyzed by P5CS and ProDH respectively. Two closely related P5CS genes were identified in *Arabidopsis thaliana*. P5CS1 is induced by drought and salt stress (Savouré et al., 1995; Yoshida et al., 1995), while the expression of P5CS2 is observed in dividing cells in cell suspension (Strizhov et al., 1997), in meristematic and reproductive tissues (Székely et al., 2008), and in response to biotic stress such as plant-pathogen incompatible interactions (Fabro et al., 2004). Similarly, two genes *ProDH1* and *ProDH2* were identified in *A. thaliana* (Funch et al., 2010; for review see Servet et al., 2012). *ProDH1* is considered to encode the main isoform involved in proline degradation. The expression of *ProDH1* is down regulated by water stress and up regulated by proline (Kiyosue et al., 1996) (Fig. 1). Although the regulation of proline metabolism is still poorly characterized, it is clear that tissue proline content depends on the tight regulation of biosynthesis and catabolism. Characterization and comparison of the signalling pathways involved in the regulation of proline metabolism have been more intensively investigated in two closely related species, *A. thaliana* and *Thellungiella salsuginea*, which is

considered as an extremophile exhibiting high tolerance to salinity, drought, and cold. In contrast to *A. thaliana*, *T. salsuginea* accumulates high levels of proline in response to salt stress and also even in its absence (Ghars et al., 2008), which indicates that this species somehow anticipates stressful conditions. In addition, while mild salt stress (75 mM NaCl) reduced the growth of *A. thaliana*, growth of *T. salsuginea* was not affected by salinity up to 300 mM NaCl (Ghars et al., 2008). Recent reports have indicated that under normal growth conditions phospholipase D (PLD) functions as a negative regulator of proline biosynthesis in *Arabidopsis* (Thiery et al., 2004) and that plants present a higher proline responsiveness to hyperosmotic stress when this regulator is abolished (Fig. 1). By contrast, calcium signalling and phospholipase C (PLC) trigger P5CS1 transcription and proline accumulation during salt stress (200 mM NaCl) (Parre et al., 2007). Interestingly, these lipid signalling pathways function in an opposite manner in the halophyte *T. salsuginea* (Ghars et al., 2012). This opposite regulation may partially explain why stress responses are upregulated in *T. salsuginea*, conferring it a very high capacity to withstand severe environmental constraints.

In *Arabidopsis*, P5CS1 expression has also been found to be stimulated by light (Hayashi et al., 2000) and nitric oxide (NO) (Zhao et al., 2009) (Fig. 1). Under osmotic and salt stresses, ABA induces *AtP5CS1* expression through the *cis*-acting ABA responsive (ABRE) element (Strizhov et al., 1997). Savouré et al. (1997) showed that stress induction of P5CS1 occurs independently of ABA upon cold and osmotic stresses. This is supported by a recent report indicating that there is significant ABA-independent expression of P5CS1 at low water potential demonstrated by comparing ABA-deficient (*aba2-1*), proline accumulation deficient (*p5cs1-4*) and double (*p5cs1-4/aba2-1*) mutants (Sharma and Verslues, 2010).

From these data, proline metabolism appears to be tightly regulated by environmental and endogenous signals. ROS, key signalling molecules produced upon environmental constraints, may play an important role in the regulation of this pathway.

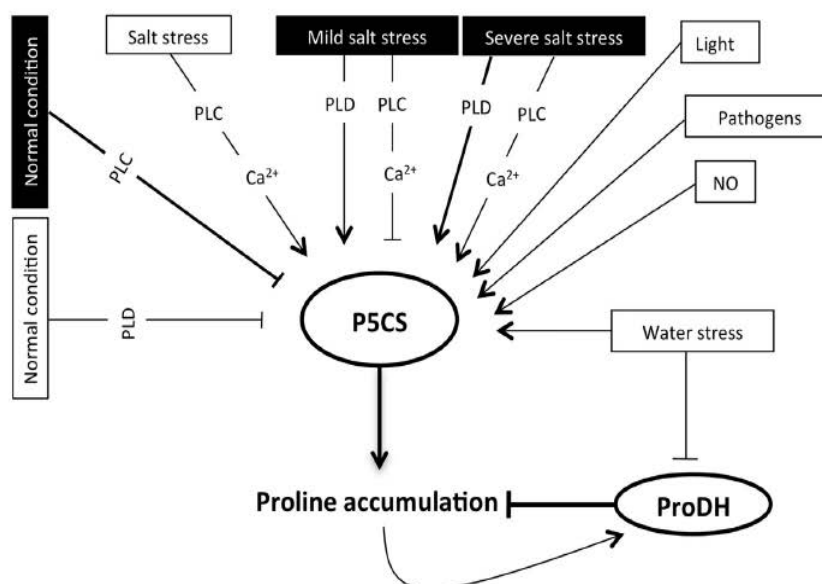


Fig. 1. Regulation of proline metabolism in plants. See text for details of the description of proline metabolism and its regulation. Most data were obtained using *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella salsuginea*. Circles designate enzymes and rectangles the environmental context; open and black boxes correspond to the signalling pathways demonstrated in *A. thaliana* and *T. salsuginea*, respectively. Abbreviations: P5CS, pyrroline-5-carboxylate synthetase; ProDH, proline dehydrogenase; PLC, phospholipase C; PLD, phospholipase D; ROS, reactive oxygen species.

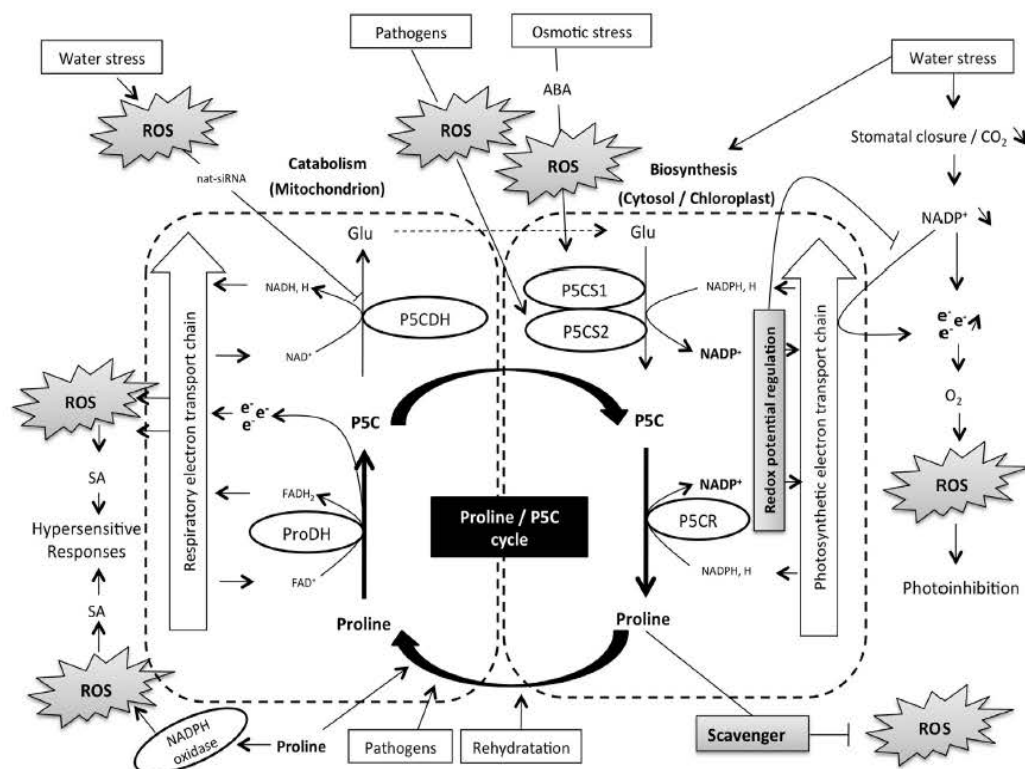


Fig. 2 Close relationship between ROS and proline metabolism. Proline accumulates in plant cells when ROS induce P5CS1 under osmotic stress or P5CS2 under biotic stress. ROS also lead to proline accumulation through P5CDH inhibition by nat-siRNA. Under certain conditions, P5C can be reduced back to proline by P5CR, activating the proline/P5C cycle. When excess proline is provided, either during natural recovery from osmotic stress or exogenously, this cycle is more active and more electrons are delivered to the mitochondrial electron transport chain leading to ROS production and generation of hypersensitive responses. Treatment with proline causes cell death in plants, possibly due to the accumulation of ROS produced by NADPH oxidase. Proline may be a scavenger of ROS. By restoring the pool of the terminal electron acceptor (NADP^+) of the photosynthetic electron transport chain, proline synthesis may reduce ROS production and provide some protection against photoinhibition under water stress. Circles designate enzymes, rectangles the environmental context, gray rectangles the role of proline, black rectangle highlights the Proline/P5C cycle and star boxes ROS. Abbreviations: ABA, abscisic acid; e^- , electrons; Glu, glutamate; P5C, pyrroline-5-carboxylate; P5CDH, P5C dehydrogenase; P5CR, P5C reductase; P5CS, pyrroline-5-carboxylate synthetase; ProDH, proline dehydrogenase; ROS, reactive oxygen species; SA, salicylic acid; nat-siRNA, small interfering RNA.

2.2. ROS signalling induces proline accumulation

It is becoming increasingly clear that many abiotic and biotic stresses activate endogenous production of ROS. ROS not have only deleterious effects in cell metabolism but also play a key role in intracellular communication that triggers the acclimation ability of plants to unfavorable environmental conditions.

In *Arabidopsis*, a positive correlation was found between proline levels and ROS concentrations when leaves were infiltrated locally with an enzymatic mix of xanthine (X) and xanthine oxidase (XO) in order to produce superoxide anions *in situ* (Fabro et al., 2004). When transgenic *AtP5CS2:GUS* or *AtP5CS2:LUC* plants were infiltrated with X and XO, GUS activity or luminescence respectively were detected at infiltration sites. These results indicate that ROS can mediate the activation of *AtP5CS2* and proline accumulation during biotic stress (Fabro et al., 2004).

Glutamate dehydrogenase (GDH) is a ubiquitous enzyme in plants and possibly plays a role in the assimilation of ammonia including under different environmental stresses. Treating tobacco (*Nicotiana tabacum*) BY-2 suspension cells with NaCl induced proteolytic activity, increased intracellular ammonium and generated ROS (Skopelitis et al., 2006). The ROS signals induced the transcription of the gene that encodes the α -subunit of GDH. It was

concluded that the induced anionic GDH assimilated excess ammonia, producing glutamate for proline synthesis in the tobacco cells.

In response to salt stress, ROS signalling from NADPH oxidase plays an important role in the regulation of the SOS pathway (Chung et al., 2008). However our unpublished data indicated that NADPH oxidases trigger proline accumulation in response to salt stress independently of the SOS pathway. The simultaneous accumulation of ROS and ABA is possibly a key aspect of cross-tolerance to multiple stresses (Pastori and Foyer, 2002). Much evidence demonstrates that osmotic stress-induced proline accumulation is partially regulated by an ABA-dependent signalling pathway (Savou  r   et al., 1997; Strizhov et al., 1997) and H_2O_2 is thought to be part of ABA signalling and ABA-regulated proline accumulation (Verslues et al., 2007). In mammalian cells exposed to physiological H_2O_2 levels, P5CS and P5CR enzyme expression increased, indicating that proline biosynthesis is upregulated in response to oxidative stress (Krishnan et al., 2008). In rice seedling leaves, Uchida et al. (2002) found that the expression of P5CS was increased in response to H_2O_2 . More recently it was shown that exogenous H_2O_2 treatment leads to a significant accumulation of proline in coleoptiles and radicles of maize seedlings by the induction of P5CS activity and the decrease in ProDH activity (Yang

et al., 2009). In *Nitraria tangutorum* callus, H_2O_2 treatment caused a significant decrease in ProDH activity and an increase in γ -glutamyl kinase activity (Yang et al., 2012), implying that H_2O_2 may be involved in regulatory signalling for proline metabolism. A member of the *RCD1* gene family, *SRO5* (similar to radical induced cell death one 5), is induced by salt and H_2O_2 treatments and this induction is required for generation of a natural *cis*-antisense gene pair to cleave *P5CDH* transcripts, which leads to proline accumulation that protects cells from the stress (Borsani et al., 2005). Wen et al. (2013) also reported that pre-treatment of sweet corn seedlings with H_2O_2 enhanced proline accumulation under $CuCl_2$ stress, the combined result of the activation of both ornithine and glutamate pathways and a reduction of the ProDH pathway.

NO, a reactive nitrogen species is also known to act as a signalling intermediate in a variety of responses to environmental constraints. Exogenous sodium nitroprusside (SNP), a potent NO donor, significantly induced proline accumulation in wheat under osmotic stress (Lei et al., 2007; Tan et al., 2008). Exposure of *Chlamydomonas reinhardtii* to increasing concentrations of Cu resulted in increased proline synthesis with a concomitant rise in intracellular NO levels (Zhang et al., 2008). The authors argued that this intracellular NO generation was involved in Cu-induced proline accumulation and signalling, largely based on the fact that the treatment with SNP increased the activity of P5CS and up-regulated expression of *P5CS* gene in Cu-treated algae.

This range of data mainly obtained using *Arabidopsis* illustrate the complexity of ROS signalling pathways and their interactions in a network triggering proline accumulation that allows the organism to adapt to stress (Fig. 2).

2.3. Trapping reducing power through proline biosynthesis to limit the generation of ROS

Proline metabolism is directly connected to the NAD(P)H/NAD(P)⁺ redox balance, making it likely that proline acts as a redox shuttle (Sharma et al., 2011; Giberti et al., 2014) (Fig. 2). Enhanced proline synthesis under drought or salt stress may be a mechanism to maintain redox potential at values suitable for metabolism (Hare et al., 1998). It is well known that stomatal closure during osmotic stress limits carbon uptake and subsequently decreases NADPH consumption by the Calvin cycle. Recently it has been proposed that proline may be synthesised from glutamate in chloroplasts (Székely et al., 2008). This requires the oxidation of two NAD(P)H molecules to NAD(P)⁺, possibly a way of recycling NAD(P)⁺ under stress. By restoring the pool of the terminal electron acceptor of the photosynthetic electron transport chain, proline synthesis may lower ROS production and provide some protection against photo-inhibition under adverse conditions (Fig. 2), thus avoiding the use of O_2 instead of NAD(P)⁺ as the electron acceptor in photosynthesis (Hare et al., 1998). The use of NAD(P)H for proline synthesis during stress possibly increases the cellular NAD(P)⁺/NAD(P)H ratio. Regulation by the NAD(P)⁺/NAD(P)H ratio is thus a link between proline biosynthesis and the reduction of NAD(P)⁺ by the two dehydrogenases responsible for transforming glucose-6-phosphate into ribulose-5-phosphate in the pentose phosphate pathway (Shetty, 2004). The production of ribulose-5-phosphate generates two molecules of NADPH and one of CO_2 . In stress conditions, the regeneration of CO_2 allows carbon reduction to continue and the NAD(P)H can be used in the biosynthesis of proline and to prevent photoinhibition and excess ROS production in the chloroplast (Verslues and Sharma, 2010). Hebbelmann et al. (2012) reported that the *Arabidopsis* knockout mutants lacking a chloroplast NADP-dependent malate dehydrogenase (*nadp-mdh*) do not use excess reducing equivalents in the Calvin cycle for carbon assimilation in response to high-light treatment. These *nadp-mdh* knockout

mutants use a combination of compensatory strategies to maintain redox homeostasis, particularly adjusting photorespiration and proline biosynthesis, which dissipate excess reducing equivalents, sustains photosynthesis and prevents photoinhibition.

Proline enhances the photosystem II-catalyzed electron transport activities of thylakoid membranes isolated from cotyledons of *Brassica juncea* seedlings grown under salt stress (Alia et al., 1991). Moreover, it was shown that proline can decrease ROS generation caused by high light intensity in isolated thylakoids, suggesting that proline prevents photoinhibitory loss in chloroplast activity by reducing generation and/or scavenging of free ROS (Alia et al., 1991).

2.4. Role of ProDH proline catabolism in ROS generation through the reduction of oxygen

ProDH is a flavoenzyme localized in the inner mitochondrial membrane, which catalyzes the first oxidizing step converting proline into P5C and the subsequent transfer of equivalents from the reduced flavin cofactor to the mitochondrial electron transport chain (Fig. 2). P5C may be either oxidized further by P5CDH to form glutamate or transported into the cytosol, where it may be converted back to proline by P5CR. Metabolic cycling of proline and P5C via ProDH and P5CR forms a proline/P5C cycle. Phang (1985) first proposed that this cycle operates in mammalian cells, where ROS are formed by p53-induced proline oxidase, leading to the induction of apoptosis that prevents tumor development (Phang and Liu, 2012). The existence and the importance of the proline/P5C cycle were described much more recently in plants (Miller et al., 2009). The proline/P5C cycle is a mechanism for transferring reducing equivalents from NAD(P)H into mitochondria and helping maintain NAD(P)⁺. When proline is in excess, either during natural recovery from osmotic stress or by exogenous supply, this cycle is more active and more electrons are delivered to the mitochondrial electron transport chain (Servet et al., 2012). In *ProDH*-overexpressing or *p5cdh* *Arabidopsis* mutants, the hyperactivity of the proline/P5C cycle would increase the chance of electrons generated from incomplete proline oxidation to overflow from mitochondrial electron transport, resulting in an elevated rate of electron transfer to O_2 leading to ROS generation (Fig. 2). Hence normal oxidation of P5C to glutamate by P5CDH is required to regulate the intensive proline/P5C cycle and control ROS production.

In plants, a relationship between proline degradation and programmed cell death (PCD) has been reported. Proline-treated plant cells undergo cell death with features consistent with the production of ROS and DNA fragmentation (Deuschle et al., 2004). In a model proposed by Chen et al. (2011), exogenous proline can induce calcium-dependent generation of ROS through NADPH oxidase. It subsequently induces the production of salicylic acid (SA) probably via NDR1-mediated signalling, resulting in symptoms strongly reminiscent of hypersensitive response (HR) during pathogenesis. Very recently, the role of the proline/P5C cycle in pathogen defence was described. By analyzing proline metabolism in the early stages of the HR, Cecchini et al. (2011) found that ProDH activity is required for development of the HR in *A. thaliana* and is possibly activated via the SA pathway. The ProDH activity coincides with ROS accumulation, suggesting that the enzyme may promote cell death by enhancing ROS levels. Apart from ProDH, the ornithine delta-aminotransferase (δ AT)-mediated reaction in mitochondria is an important direct source of P5C (Funck et al., 2008). The high level of coordination between ProDH and δ AT enzymes to defend against non-host pathogen infection can result in tight regulation of P5C metabolism and higher levels of ROS production (Senthil-Kumar and Mysore, 2012). It has recently emerged that ROS derived from ProDH activity may also extend life span. Knockdown

of ProDH in a *Caenorhabditis elegans* *daf-2* mutant was shown to significantly decrease life span (Zarse et al., 2012). Supplementing wild-type worms with proline was also found to extend life span. Proline catabolism may generate transient ROS signals that lead to increased expression of antioxidant enzymes and hence longer life spans (Zarse et al., 2012).

2.5. Proline as a ROS scavenger

The capacity of proline to protect against damage by ROS can also account for its role as a component of an antioxidative network involved in mitigating the effects of stress-induced oxidative damage. Smirnoff and Cumbe (1989) have first shown that proline was an effective hydroxyl radical scavenger. A proline nitroxyl radical R_2NO was already known to be formed between proline and OH (Floyd and Nagi, 1984). Later, Alia et al. (2001) and Matysik et al. (2002) proposed that proline could deactivate 1O_2 by physical quenching. Yet, recent evidence that proline cannot quench 1O_2 in aqueous buffer (Signorelli et al., 2013) may lead to reconsider the assumption about a likely scavenging role of proline against 1O_2 in plants under stress. These authors proposed a proline–proline cycle that may act in scavenging OH. In this cycle proline captures a first OH by H-abstraction, followed by a second H-abstraction, which also captures another OH, yielding P5C. P5C is then recycled back to proline by the action of the P5CR/NADPH enzymatic system (Signorelli et al., 2014). In a biological context, Chen and Dickman (2005) reported that exogenous application of proline inhibited ROS-induced PCD caused by nutritional stress in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. In mammalian cells, overexpression of biosynthetic enzymes such as P5CS1 and P5CR resulted in two-fold higher proline content, significantly lower ROS levels, and increased cell survival relative to control cells (Krishnan et al., 2008). Swingle citrumele rootstocks were transformed with the *Vigna aconitifolia* P5CSF129A gene and the drought tolerance of the transgenic plants was evaluated (de Campos et al., 2011). The transgenic plants over-accumulated proline and were able to cope with water deficit stress by osmotic adjustment and by mitigating the deleterious effects of drought-induced oxidative stress. This was demonstrated by the lower content in malondialdehyde (MDA), a product of the free radical damage of lipids, detected in transgenic leaves in comparison to controls. A negative relationship between proline and lipid peroxidation was also detected in transgenic sugarcane overexpressing the P5CSF129A gene (Molinari et al., 2007). Transgenic algae expressing the P5CS gene have more free proline than the wild type and the free proline levels are negatively correlated with MDA levels in heavy metal-treated algae (Siripornadulsil et al., 2002). These results suggest that free proline acts as an antioxidant in Cd-stressed cells. Stress-inducible proline accumulation might therefore act as a component of an antioxidative defence system to counteract the deleterious effects of oxidative stress, by directly scavenging free radicals or by activating antioxidant systems.

2.6. Proline stimulates antioxidant system

In addition to its direct role, proline is also known to act indirectly by scavenging ROS by enhancing the plant antioxidant defence system. The role of proline in plant responses to oxidative stress has been demonstrated extensively in experiments in which exogenous proline was applied (Hoque et al., 2007; Ozden et al., 2009) or in which proline synthesis or degradation was genetically engineered (Hong et al., 2000; Kocsy et al., 2005; Molinari et al., 2007).

Addition of proline improved the growth of cultured tobacco cells (BY-2) under salt stress (Hoque et al., 2007). BY-2 cells showed significant decreases in the activities of SOD, catalase (CAT) and

peroxidase (POD) under salt stress, but exogenously applied proline alleviated the salt-stress effects on CAT and POD activities (Hoque et al., 2007). Exogenous application of proline enhanced the activity of SOD in soybean callus (Hua and Guo, 2002) and in melon plantlets under salt stress (Yan et al., 2011). Furthermore, Banu et al. (2009) reported that exogenous application of proline to tobacco cells submitted to salt stress increased the mRNA levels of CAT-related genes. In salt-treated mung bean that had been pre-treated with proline, Hossain et al. (2011) showed an increase in the ascorbate (AsA) and glutathione (GSH) content, the GSH/glutathione disulfide (GSSG) ratio and higher activities of ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR), catalase (CAT), with decreases in H_2O_2 and MDA levels. Xu et al. (2009) suggests that proline could contribute to the detoxification of O_2^- radicals by increasing the activity of superoxide dismutase (SOD) in *Solanum* under Cd stress.

In transgenic citrus plants carrying heterologous P5CS112A, high endogenous proline caused an increase in transcript levels of cytosolic APX and chloroplast GR and Cu/Zn SOD isoforms (de Carvalho et al., 2013).

From these data, it is becoming clear that proline can act as a regulatory and/or signalling molecule capable of altering the expression of antioxidant-related genes involved in the plant response to environmental constraints (de Carvalho et al., 2013).

3. Conclusions and prospects

In the last couple of years, our knowledge of ROS signalling has increased tremendously so we are now becoming aware of how important these pathways are for plant acclimation to various stresses. There is increasing evidence of cross-talk between these signalling pathways and proline metabolism in plant cell. Depending of their concentrations, ROS play a dual role in plants as both toxic compounds and regulators of many biological processes. Proline metabolism also has a dual function as a ROS scavenger and as a pro-oxidant via ProDH activity. In response to stress, accumulation of proline may participate to the scavenging of ROS in addition to its role as an osmolyte. Interestingly as it was shown in animal cells and in plants in response to pathogens, ProDH activity as well as the P5C–proline cycle also significantly participate to the generation of ROS. In addition of being tightly regulated, proline metabolism appears to play a key role in triggering signal molecules such as ROS, which are involved in triggering cell death or in allowing the adaptation of cells and organisms to various environmental constraints. With increasing evidence of a close relationship between ROS and proline metabolism, reports on their relationship and inter-regulation under stress are still very limited. Further research into the biochemical and molecular mechanisms involved in the regulation of these enzymes are of importance. More detailed analyses might reveal novel and interesting links, which may contribute to a better understanding of the role of these compounds in the adaptation of plants, possibly leading to the development of genetically enhanced plants with greater tolerance of environmental constraints.

Acknowledgments

This work was supported by the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research (LR10CBBC02) and the Tunisian-French CMCU (Comité Mixte de Coopération Universitaire) network (13C0929). Part of this study was supported by European Union COST program FA0901.

Contributions

All authors contributed to the writing of the manuscript. AS edited the paper.

Chapitre II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel et Méthodes

Les résultats présentés au cours de cette thèse sont sous forme d'articles ou de manuscrits, qui comportent une section décrivant les procédures expérimentales mises en œuvre. Dès lors, ce chapitre se limite à apporter des précisions sur les stratégies utilisées, les principes expérimentaux et certains protocoles spécifiques.

1. Matériel végétal

Le modèle végétale utilisé est la plante *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *A. thaliana* est aussi appelée dans le langage courant l'Arabette des dames. C'est une plante annuelle qui appartient à la famille des Brassicaceae. *Arabidopsis* est de petite taille (environ 20-30 centimètres) et présente un cycle de vie court (six à huit semaines de graines à graines). *Arabidopsis* a un petit génome, d'environ 120 millions de paires de bases, entièrement séquencé depuis 2000 par «The Arabidopsis Genome Initiative» (2000). Le génome d'*Arabidopsis* contient approximativement 25500 gènes, répartis sur cinq paires de chromosomes.

Les plantes sauvages d'*A. thaliana* utilisées sont d'écotype Columbia 0 (Col-0). Le mutant d'insertion ADN-T d'*Arabidopsis* *p5cs1-4* (gène P5CS1: AT2G39800), de l'accession Col-0, nous a été gracieusement fourni par le professeur László Szabados (Institute of Plant Biology, Biological Research Center, Szeged, Hungary). Les mutants d'insertion de transposons (dSpm) d'*Arabidopsis*, de l'accession Col-0, *atrboh3* (gène RBOHD: AT5G47910), *atrboh3* (gène RBOHD: AT5G47910), *atrboh3* (gène RBOHD: AT5G47910) et le double mutant *atrboh3/f* ont été commandés sur le site web du Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC, <http://arabidopsis.info/>), N9555, N9557 et N9558, respectivement. D'autres lignées d'insertion ADN-T ont également été utilisées afin de confirmer les résultats obtenues avec les lignées d'insertion de transposons. Ces lignées correspondent aux lignées SALK *atrboh3* (SALK_070610) et *atrboh3* (SALK_059888) et ont été fournies par le professeur Jörg Durner (Institute of Biochemical Plant Pathology, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, Germany).

2. Conditions de culture des plantes

2.1. Amplification des lignées d'*Arabidopsis thaliana*

L'amplification des lignées a été prise en charge par l'équipe "Plateforme de Culture de Plantes" du laboratoire d'Adaptation des Plantes aux Contraintes Environnementales (APCE) à l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC, France). Les graines sont semées en chambre de culture (photopériode de 16 h, température comprise entre 22°C et 24°C) sur terreau. Pendant la première semaine, les plantules sont recouvertes d'un pot en plastique transparent de façon à conserver un fort taux d'humidité et ainsi favoriser la germination et la croissance. Les plantes sont sub-irriguées de façon hebdomadaire pendant 5 semaines environ puis laissées à dessécher. Une fois les siliques à maturité, les graines sont récoltées. Celles-ci sont stockées dans des pochettes en plastique ou papier à température ambiante.

2.2. Culture in vitro

Les graines sont d'abord stérilisées dans un tube Falcon contenant 25 mL d'eau milliQ, 25 mL d'hypochlorite de sodium, 1 mL d'acide acétique et 10 gouttes de tween 20. Le mélange est agité régulièrement pendant 10 min au maximum. Après sédimentation des graines, le surnageant est jeté. Sous une hotte à flux laminaire, six rinçages à l'eau milliQ stérile sont effectués. Ensuite, les graines sont reprises dans de l'agar noble 0,1 % à raison de 1 mL pour 5 mg de graines. Sous la hotte, les graines stérilisées sont semées sur des petites grilles métalliques d'environ 4,5 cm de diamètre, posées sur un milieu MS/2 (Murashige et Skoog) solide (0,8% d'agar de type A) contenant 1 % de saccharose, 0,05 % de MES, des vitamines Gamborg B5 1X (sigma G1019), pH 5,7 et laissées une nuit à 4° C à l'obscurité afin de synchroniser la germination. Enfin, La croissance des plantules est effectuée en chambre de culture pendant 12 jours en éclairage continu à 90 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, et à 22°C.

Pour appliquer les traitements salins ou hyperosmotiques, les grilles métalliques contenant les plantules sont transférées vers d'autres boîtes de Pétri de 5 cm contenant 7 mL de milieu MS/2 liquide de même composition que décrit précédemment additionné de 200 mM NaCl ou avec 400 mM de mannitol.

Lorsque des inhibiteurs sont utilisés, les plantules sont prétraitées pendant 4 h dans du milieu MS/2 liquide avec l'inhibiteur. Après la pré-incubation, le stress est appliqué par

transfert des filtres vers d'autres boîtes de Pétri de 5 cm contenant MS/2 avec 200 mM NaCl ou avec 400 mM mannitol en présence ou en l'absence d'inhibiteurs.

2.2. Culture sur sable

Les graines sont semées directement sur un mélange sable:vermiculite (3:1) dans des petits pots puis sont recouverts avec un pot en plastique transparent pendant une semaine et sont placés en serre vitrée ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ radiation photosynthétique active, température $25 \pm 5^\circ \text{C}$, humidité relative $60 \pm 10\%$). Les plantules sont arrosées régulièrement avec de l'eau pendant la première semaine puis avec de la solution nutritive Hewitt (1960), diluée 4 fois.

3. Techniques analytiques

3.1. Analyse physiologique

3.1.1. Croissance Moyenne Relative (CMR)

La CMR représente la quantité de matière sèche produite par 1g de matière sèche et par unité de temps. Elle est calculée selon la formule de Beadle (1993)

$$\text{CMR (j}^{-1}\text{)} = \text{Ln (MS}_2 / \text{MS}_1) / \Delta t$$

MS est la matière sèche en (mg) et Δt correspond à la durée du traitement (jour) entre récolte 2 (finale) et la récolte 1 (initiale)

La CMR, exprimée en jour^{-1} , a l'avantage de permettre une meilleure estimation des effets des traitements sur l'activité de croissance puisqu'elle élimine les variations de production de la MS liées à la vigueur initiale des plantes.

3.1.2. Teneur Relative en Eau (TRE)

La teneur relative en eau de la feuille a été déterminée par la méthode décrite par Barrs, (1968). Selon cette méthode, les feuilles sont coupées à la base du limbe, elles sont pesées immédiatement pour obtenir leur masse de matière fraîche (MF). Ces feuilles sont

mises par la suite dans des tubes à essai remplis d'eau distillée et placés à l'obscurité dans un endroit frais, après 24 h les feuilles sont retirées, passées dans un papier buvard pour absorber l'eau de la surface, pesées de nouveau pour obtenir la masse des feuilles à la pleine turgescence (MT). Les échantillons sont enfin mis à l'étuve régler à 60° C pendant 48h et pesés pour avoir leur masse de matière sèche (MS). La teneur relative en eau est calculée par la formule suivante (Ben Amor et al., 2006) :

$$\text{TRE (\%)} = [(\text{MF}-\text{MS}) / (\text{MT}- \text{MS})]\times 100$$

3.1.3. Mesure du potentiel osmotique

Le potentiel osmotique est mesuré sur un extrait foliaire: Les feuilles fraîchement récoltées et congelées dans l'azote liquide sont rapidement broyées dans un mortier en porcelaine en présence de l'azote liquide. Après centrifugation dans des tubes Eppendorf à 15,000 g pendant 30 min à 4° C, le surnageant est récupéré. Cette méthode (Martínez-Ballesta et al., 2004) permet l'extraction de la totalité de la sève à partir des feuilles. Le potentiel osmotique est déterminé après la mesure de l'osmolarité de la sève foliaire au moyen d'un osmomètre de pression de vapeur (Osmomat 030, Genotec, Berlin, Germany). Les pressions osmotiques des échantillons sont calculées par la loi de Van't Hoff :

$$\Psi_{\pi} \text{ (MPa)} = \text{c.R.T}$$

C : Osmolarité (mosm.L⁻¹)

R : constante des gaz parfaits (8,314 J mol⁻¹ K⁻¹)

T : Température en K (20° C = 293,15°K)

3.1.4. Mesure des échanges gazeux

L'assimilation nette de CO₂ (A), la conductance stomatique (g_s) et la concentration intercellulaire en CO₂ (C_i) ont été déterminées par un système portable de photosynthèse (LCA4). Les mesures ont été directement effectuées entre 10:00 et 12:00 sur les feuilles des plantes soumises à divers traitements. Les valeurs de ces paramètres ont été prises après stabilisation des niveaux photosynthétiques.

3.1.5. Fluorescence chlorophyllienne

La fluorescence chlorophyllienne est mesurée avec un fluoromètre type monitoring system (OS1-FL). Cet appareil consigne automatiquement la fluorescence initiale (F0): c'est la valeur minimale de la fluorescence lorsque tous les accepteurs d'électrons du photosystème II (PSII) sont complètement oxydés. La fluorescence initiale F0 a pour origine les chlorophylles qui forment les antennes collectrices du PSII. La fluorescence maximale (Fm) correspond à la valeur maximale de la fluorescence obtenue pour la même intensité lumineuse. Cette valeur est obtenue lorsque toutes les premières quinones acceptuses d'électrons sont complètement réduites et le rendement quantique est exprimé par le rapport $(F_m - F_0)/F_m = F_v/F_m$, dans lequel F_v est la fluorescence variable. Le rendement quantique traduit l'efficacité du PSII à utiliser la lumière pour la conversion photochimique (effet Kausky, Figure 8). La valeur du rendement quantique approche la valeur de 0.8 chez une plante non stressée, et diminue chez les plantes soumises à la contrainte (Eyletters et Bourrie, 1996).

Pour ce faire le limbe foliaire est placé à l'obscurité durant 30 minutes dans le clip du fluoromètre. Sur le plan physiologique, cette opération supprime le flux des photons source d'énergie pour la photosynthèse, ceci vide la chaîne de transfert d'électrons. Les centres réactionnels sont alors totalement disponibles. Un flash lumineux est envoyé sur la surface testée. Les accepteurs d'électrons du PSII sont saturés. L'énergie lumineuse excédant les possibilités de collecte du PSII est alors réémise sous forme de fluorescence, selon une cinétique particulière. Ensuite, la chaîne de transfert d'électrons s'enclenche et atteint un régime stationnaire. L'intensité de la fluorescence monte rapidement d'une valeur initiale F0 vers une valeur maximale (Fm) en moins d'une seconde.

3.1.6. Dosage de la chlorophylle

L'extraction de la chlorophylle a et b est réalisée selon la méthode de Lichtenthaler (1987). Environ 100 mg de feuilles sont coupés en petits morceaux et mis dans 5 mL d'acétone 100 % dans des boîtes noires (pour éviter l'oxydation de la chlorophylle par la lumière), 48 h plus tard, on procède à la lecture des densités optiques des solutions avec un

spectrophotomètre, à deux longueurs d'ondes : (645 et 662 nm). La détermination des teneurs réalisée selon les formules

$$\text{Chl a } (\mu\text{g/g MF}) = 12,7 \times \text{DO}(662) - 2,59 \times \text{DO}(645) \times V / (1000 \times \text{MF}) .$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g/g MF}) = 22,9 \times \text{DO}(645) - 4,68 \times \text{DO}(662) \times V / (1000 \times \text{F}).$$

$$\text{Chl(a+b)} (\mu\text{g/g MF}) = \text{Chl a} + \text{Chl b}$$

V : volume solution extraite et MF la masse de matière fraîche de l'échantillon

3.1.7. Dosage des ions sodium et potassium

Après dessiccation, le matériel végétal est réduit en poudre fine au moyen d'un mortier en porcelaine. Des quantités connues de poudre végétale (de l'ordre de 30 mg) préalablement desséchées sont attaquées par l'acide nitrique (HNO_3) à 0,5% sous une température ambiante pendant 4 jours. Les extraits sont par la suite filtrés sur du papier filtre. Les ions Na^+ et K^+ sont dosés par photométrie à flamme (photomètre Corning).

3.2. Analyse biochimique

3.2.1. Détermination de la proline

Le contenu en proline libre est déterminé par la méthode de Bates et al. (1973). Des plantules congelées sont broyées mécaniquement durant deux cycles de 30 s, à l'aide d'un broyeur à billes (Retsch MM301). 50 mg de la poudre obtenue est remise en suspension dans 1,5 mL d'acide sulfosalicylique à 3 % (m/v) et l'homogénat est centrifugé à 14,000 g pendant 10 min à 4° C. 1 mL du surnageant est mélangé avec 1 mL de tampon ninhydrine (0,1% ninhydrine (m/v) dans 60 % acide acétique 100% et 40 % d'acide orthophosphorique 6 M) et 1 mL d'acide acétique. Après 1 h au bain-marie bouillant, la réaction est arrêtée par refroidissement dans de la glace. Ensuite, 2 mL de toluène sont ajoutés et l'ensemble est agité pendant 1 min avant incubation à température ambiante. La densité optique du complexe coloré est mesurée à 520 nm. Une courbe étalon est réalisée à partir d'une solution mère de L-proline à 1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ préparée dans l'acide sulfosalicylique pour des valeurs comprises entre 0 et 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de proline. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{moles proline.g}^{-1} \text{MF}$.

3.2.2. Estimation de la peroxydation des lipides

La peroxydation des lipides est estimée par mesure du malondialdéhyde (MDA) produit, capable de réagir avec l'acide 2-thiobarbiturique (TBA). L'extraction et le dosage du MDA ont été réalisés selon la méthode décrite par Ben Amor et al. (2006). 100 mg du matériel végétal congelé sont homogénéisés avec 2 mL d'acide trichloroacétique (TCA) 0.1% (v/v) à 4° C. Le broyat obtenu est centrifugé à 15,000 g pendant 15 min à 4° C. Le surnageant est incubé avec un mélange TCA (20%) et TBA (0,5%) dans un bain marie pendant 30 min à 95° C et la réaction est arrêtée par refroidissement du mélange dans la glace. Par la suite, l'homogénat subit une deuxième centrifugation à 10,000 g pendant 10 min. Le surnageant est utilisé pour la lecture de l'absorbance à 532 nm. La concentration en MDA est calculée en utilisant le coefficient d'extinction ($155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) après la soustraction de l'absorbance à 600 nm.

3.2.3. Détection du peroxyde d'hydrogène par le DAB

Le peroxyde d'hydrogène est détecté par méthode colorimétrique utilisant le 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (D5637, Sigma-Aldrich). Le peroxyde d'hydrogène entraîne une oxydoréduction avec polymérisation de la molécule de DAB donnant un précipité marron stable. Les plantules entières sont immergées et infiltrées durant trois cycles de 10 min, dans une solution de DAB $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ajustée à pH 3,8 avec du KOH. La solution DAB est préparée avant chaque expérimentation afin d'éviter toute auto-oxydation (Thordal-Christensen et al., 1997). Les plantules sont ensuite dépigmentées dans une solution bouillante d'éthanol. Une fois les pigments éliminés, les plantules sont stockées dans une solution glycérol-éthanol (1/4, v/v) jusqu'à la prise des photographies. Les images ont été prises à l'aide d'une caméra AxioCam (Zeiss) et du logiciel Axiovision.

3.2.4. Détection du peroxyde d'hydrogène par H₂DCFH

Le peroxyde d'hydrogène est détecté par méthode fluorométrique utilisant le 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCFDA) (D6883, Sigma-Aldrich). Le H₂DCFDA, composé

non fluorescent, lorsqu'elle rentre dans la cellule est déacétylée par les estérases intracellulaires en dichlorofluoresceine (DCFH) et qui réagit avec le H_2O_2 intracellulaire pour former un composé fluorescent, la dichlorofluoresceine (DCF). Les racines sont incubées pendant 15 min en présence de $25\ \mu\text{M}$ H_2DCFDA à l'obscurité, puis les racines sont lavées au tampon potassium phosphate (20 mM, pH 6). Les signaux fluorescents sont visualisés en utilisant une microscopie de fluorescence (ApoTome, Zeiss) avec une longueur d'onde d'excitation à 488 nm pour des émissions à 530 nm.

3.2.5. Détection du peroxyde d'hydrogène par microscopie électronique à transmission

Le peroxyde d'hydrogène est détecté par méthode cytochimique utilisant le cérium chloride (CeCl_3) selon la méthode décrite par Bestwick et al. (1997). Cette méthode est basée sur la réaction du H_2O_2 avec le CeCl_3 pour donner des précipités de peroxyde de cérium insolubles et denses aux électrons et donc détectables par microscopie électronique à transmission. Les plantules entières sont immergées et infiltrées dans une solution de CeCl_3 (5 mM) pendant 30 min. Les feuilles sont fixées à 4°C par une solution de glutaraldéhyde 1,25 % et paraformaldéhyde 1,25 % pendant 1 h et post fixées dans une solution de tétroxyde d'osmium OsO_4 (1 %). Après trois lavages au PBS, les échantillons sont déshydratés dans des bains successifs d'éthanol de concentrations croissantes (25 à 100 %). Les échantillons sont inclus dans de la résine, ensuite, ils sont coupés à l'aide d'un ultra-microtome. Les coupes d'épaisseurs 60 à 70 nm sont déposées sur une grille de cuivre et colorées par l'acétate d'uranyle. Les observations ont été faites à l'aide d'un microscope électronique à transmission de type Zeiss921 Omega.

3.2.6. Dosage du peroxyde d'hydrogène par spectrophotométrie

La concentration en H_2O_2 a été déterminée par spectrophotométrie selon la méthode décrite par Oracz et al. (2009). 300 mg du matériel végétal frais sont broyés dans un mortier dans la glace avec 1 mL d'acide perchlorique (0,2 M). Le broyat obtenu est centrifugé à 13,000 g pendant 14 min à 4°C . Le surnageant résultant est neutralisé à pH 7,5 avec KOH 4 M, puis centrifugés à 13,000 g pendant 10 min à 4°C . Le surnageant a été immédiatement utilisé pour la détermination spectrophotométrique de H_2O_2 en utilisant la peroxydase (Horseradish

peroxidase) avec le 3-méthyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH) et l'acide 3-(diméthylamino)-benzoïque (DMAB). Le H_2O_2 réagit avec le MBTH et le DMAB en présence de peroxydase, pour produire une indamine colorée présentant un maximum d'absorption à 590 nm. L'intensité de la coloration produite est directement proportionnelle à la concentration en H_2O_2 dans l'échantillon.

3.2.7. Extraction des protéines totales

Environ 300 mg de plantules congelées sont broyées dans l'azote liquide et extraits dans 5 mL de tampon d'extraction contenant 0,1 M tampon potassium-phosphate (pH 7,8), 2 mM dithiothréitol, 0,1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1.25 mM polyethylene glycol 4000 et 10 % (m/v) of polyvinylpolypyrrolidone (PVP). Dans le cas spécifique de la mesure de l'activité enzymatique de l'ascorbate peroxydase (APX), les plantules sont broyées dans une solution de tampon potassium-phosphate (50 mM, pH 7) contenant de l'ascorbate (1 mM) de l'EDTA (0,1 mM) et du PVP 1% (m/v). Les extraits obtenus sont centrifugés pendant 30 min à 14,000g. Un volume de 2,5 mL de ces extraits bruts est passé sur une colonne de dessalage PD 10 (GE Healthcare) (préalablement saturées en tampon d'élution par 3 passages successifs) afin d'éliminer les composés de faible masse moléculaire tels que les sels, les composés phénoliques ou les cofacteurs pouvant interférer avec l'activité enzymatique. Les extraits sont ensuite élués par passage de 3,5 mL de tampon d'élution sur ces mêmes colonnes. L'éluât obtenu est utilisé pour la mesure des activités enzymatiques.

3.2.8. Dosage de protéines

La teneur en protéines des différents extraits obtenus est quantifiée par spectrophotométrie à 595 nm selon la méthode de Bradford (1976), à l'aide du kit "Protein Assay" de Bio-Rad. La quantité de protéines est évaluée à l'aide d'une courbe d'étalonnage réalisée avec des quantités connues d'albumine d'origine bovine (de 0 à 10 μg).

3.2.9. Mesure des activités enzymatiques

3.2.9.1. Activité Superoxyde dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1)

L'activité superoxyde dismutase (SOD) est déterminée en utilisant la méthode de Beauchamp and Fridovich (1971), qui mesure par spectrophotométrie à 560 nm l'inhibition de la réduction photochimique du nitrobleu de tétrazolium (NBT) par l'anion superoxyde produit suite à la photoréaction de l'oxygène et de la riboflavine en présence d'un donneur d'électron comme la méthionine. Une unité d'activité SOD est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour une inhibition de 50% du taux de réduction du NBT. Le milieu réactionnel est constitué de 2,2 mL de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,8), de 0,25 mL de méthionine (13 mM), de 0,25 mL de riboflavine (1,2 µM), de 0,25 mL de NBT (63 µM) et 50 µL de l'extrait. La réaction est effectuée à 25°C sous une intensité lumineuse de 500 watt pendant 15 min. La réaction est ensuite arrêtée en plaçant la plaque à l'obscurité et à 4°C pendant environ 10 min, puis l'absorbance est lue au spectrophotomètre. Un témoin est réalisé et placé directement à l'obscurité. Le maximum de réduction photochimique du NBT, Amax, est déterminé à partir de puits exposés à la lumière et contenant le mélange réactionnel sans extrait enzymatique. Le pourcentage d'inhibition de la réaction photochimique du NBT par les SODs est calculé selon la formule :

$$\text{SOD} = (\% \text{ inh} / 50) / (C_{\text{prot}} * V_e)$$

avec

$$\% \text{ inh} = ((A_e / A_c) * 100)$$

C_{prot} : concentration en protéine obtenues par la méthode de bradford (mg / mL)

V_e : volume de l'extrait

% inh : pourcentage d'inhibition de la réaction de formation du formazan

A_e : absorbance de l'extrait (Abs_{lumière} – Abs_{obscurité})

A_c : absorbance du contrôle

3.2.9.2. Activité Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6)

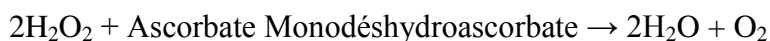
La CAT catalyse la décomposition du H₂O₂ en H₂O et O₂. L'activité catalase (CAT) est mesurée par spectrophotométrie selon la méthode décrite par Aebi (1984), en suivant la disparition du peroxyde d'hydrogène à 240 nm. Le milieu réactionnel est constitué de 2,55

mL de tampon phosphate (50 mM, pH 7) et de 200 μ L d'extrait enzymatique. La réaction est initiée par l'ajout de 250 μ L d' H_2O_2 (37,5 mM). La réaction est suivie par l'enregistrement de l'absorbance à 240 nm pendant une minute.

3.2.9.3. Activité ascorbate peroxydase (APX) (EC 1.11.1.11)

L'activité ascorbate peroxydase (APX) est mesurée par spectrophotométrie selon la méthode de Nakano and Asada (1981) en suivant l'oxydation de l'ascorbate par le peroxyde d'hydrogène à la longueur d'onde de 340 nm

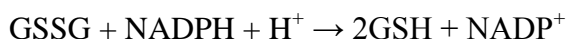
La réaction catalysée est la suivante :



Le milieu réactionnel est constitué du tampon phosphate (50 mM, pH 7), d'acide ascorbique (0,5 mM), du H_2O_2 (0,4 mM) et d'extrait enzymatique. L'activité enzymatique est calculée en utilisant le coefficient d'extinction de l'ascorbate qui est de $2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.2.9.4. Activité Glutathion réductase (GR) (EC 1.6.4.2)

L'activité glutathion réductase (GR) est mesurée par spectrophotométrie selon la méthode de Smith et al. (1988) en suivant la disparition du NADPH à 340 nm. La réaction catalysée est la suivante :



Le milieu réactionnel est constitué de 400 μ L de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,8), de 25 μ L de glutathion oxydé (10 mM), de 25 μ L de NADPH (0,5 mM), de 50 μ L MgCl_2 (3 mM) et 100 μ L d'extrait enzymatique. La réaction est initiée par l'ajout du $\text{NADPH} + \text{H}^+$. L'activité enzymatique est suivie en fonction du temps par mesure de l'absorbance à 340 nm (une mesure toutes les minutes pendant 30 min à 25°C). La quantité de glutathion réduit par seconde est calculée à partir de la pente initiale en utilisant la valeur de coefficient d'extinction du NADPH à 340 nm, $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.3. Analyse moléculaire

3.3.1. Quantification relative de l'expression des gènes

3.3.1.1. Extraction des ARNs totaux

Les ARNs sont extraits en suivant le protocole du RNeasy Plant Mini kit de Qiagen. Pour lyser les cellules, 450 μL de tampon RLT additionné de β -mercaptoéthanol 1 % (v/v) sont ajoutés à 100 mg de poudre végétale congelée. Le tout est agité au moyen d'un vortex pendant 1 min. Le lysat est transféré sur une colonne qui permet de filtrer les débris cellulaires et qui est centrifugée 3 min à 13000 rpm. Les ARNs sont précipités avec 225 μL d'éthanol absolu et fixés à la membrane de silice d'une nouvelle colonne après 30 s de centrifugation à 10000 rpm. Les ARNs sont lavés avec 350 μL de tampon RW1 (centrifugation 30 s à 10000 rpm) puis immédiatement traités à la DNase (RNase-free DNase Set, Qiagen): sur chaque échantillon est déposé un mélange de 10 μL de DNase et de 70 μL de RDD (RNase-free DNA Digest Buffer) pendant 15 min à température ambiante. Les ARNs sont lavés une seconde fois avec 350 μL de tampon RW1 (centrifugation 30 s à 10000 rpm). La colonne est lavée deux fois avec 500 μL de tampon RPE (30 s puis 2 min de centrifugation à 10000 rpm). Les ARNs ont ensuite été quantifiés à 260 nm au spectrophotomètre (Nanovue® spectrophotometer GE Healthcare Life Science). Leur qualité a été vérifiée par dépôt d'une fraction de 1 μL de l'échantillon, additionnés de 4 μL d'eau et 1 μL de bleu de charge 6X (Fermentas #R0611) dans un gel d'agarose 0,8 % (p/v) en TAE 0,5X, et mis à migrer dans du TAE 0,5X pendant environ 20 min à 100 mV. La qualité des ARN a été visualisée en plaçant le gel sous UV.

3.3.1.2. Synthèse d'ADNc

Les ADNc ont été générés à partir de 1,5 μg de matrice ARN en utilisant la transcriptase inverse (RT) Revert™ Reverse Transcriptase (Fermentas #EP0441). Des tubes contenant 1,5 μg d'ARN extrait, 2 μL d'oligonucléotides-dT (10 mM) et complétés à 13 μL avec de l'eau, ont été incubés 5 min à 70° C. On a ajouté ensuite dans chaque tube 2 μL de tampon 1X (Buffer M-MuLV RT Fermentas), 1 μL de dNTPs (10 mM) et 1 μL de RT (200 unités). Les tubes sont alors incubés au bain marie à sec pendant 60 min à 37° C. A la fin de la réaction, 60 μL d'eau milliQ sont ajoutés et les tubes sont stockés à -20°C.

3.3.1.3. RT-PCR semi-quantitative

La réaction de PCR est faite dans un volume de 25 μL . 1 μL d'ADNc est ajouté au mélange suivant: 2,5 μL du tampon 10X de la Taq ADN polymérase; 0,25 μL d'un mélange de dNTP (10 mM); 1,25 μL de chaque amorce et 0,1 μL de Taq polymérase et complété avec de l'eau stérile.

3.3.2. Analyse des protéines

3.3.2.1. Electrophorèse en conditions dénaturantes

Les protéines solubilisées dans le tampon de type Laemmli sont séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE). Les protéines sont d'abord concentrées sur gel de concentration à 4 % d'acrylamide à voltage constant (30 V) pendant environ 30 min puis séparées sur gel résolutif à 8 % d'acrylamide à voltage constant (80 V) pendant environ 2 h, jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel. La migration s'effectue dans un tampon de migration (Tris-glycine, Laemmli, 1970).

3.3.2.2. Transfert sur membrane (Western-blot)

Après migration sur un gel SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF à l'aide d'un système de « sandwich » composé de deux éponges et de six feuilles de papier Whatman (de même taille que le gel) imbibées de tampon de transfert. Le montage est maintenu par une grille en plastique, et placé dans une cuve de migration verticale contenant le tampon de transfert. Le transfert s'effectue à 120 V pendant 120 minutes sous agitation permanente dans un système de migration (Biorad) refroidi par un bloc de glace. L'efficacité et la qualité du transfert sont contrôlées par coloration de la membrane de PVDF dans une solution de rouge ponceau S pendant 20 minutes et décoloration au méthanol. La décoloration complète de la membrane est réalisée par un bain de 10 minutes dans une solution de T-TBS.

3.3.2.3. Révélation immunologique

Sous agitation constante et à température ambiante, la membrane est d'abord saturée pendant une heure dans du PBS-T ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,3, Tween 0,05 %) contenant du lait écrémé à 5 %. Puis elle est rincée quatre fois 10 min dans du PBS-T avant d'être incubée pendant une nuit dans l'anticorps primaire (l'anticorps est dilué dans du PBS-T-Lait écrémé 5 % au 1/1000ème pour l'anti-P5CS). La membrane est de nouveau rincée quatre fois 10 min dans du PBS-T avant d'être incubée pendant deux heures avec l'anticorps secondaire (Anticorps anti-lapin Amersham NA934), dilué dans du PBS-T-Lait écrémé 5 % au 1/1500ème). Quatre derniers rinçages de dix minutes sont réalisés avant une détection de type ECL. L'anticorps secondaire est couplé à la peroxydase de raifort (HRP). La réaction chimique consiste en l'oxydation du luminol par le peroxyde d'hydrogène, catalysé par la HRP, en condition alcaline. La membrane est incubée pendant une minute avec un mélange équivolume des deux substrats de la HRP (1 mL de réactif 1 + 1 mL de réactif 2, ECL Western Blotting reagents, Amersham-Biosciences). La membrane est ensuite entourée d'un film plastique (SARAN) et mise dans une cassette à rayons X pour être exposée avec un film autoradiographique (Kodak) avec des temps d'exposition allant de 1 à 15 min. Le film est révélé en chambre noire placé dans un bain de révélation (révélateur KODAK, dilué au 1/5) jusqu'à apparition du signal, rincé, puis protégé par un bain dans du fixateur (Fixateur KODAK, dilué au 1/5). Le film est finalement rincé et séché.

Chapitre III/ Article 3:

**HYPERSENSIBILITÉ A LA CONTRAINTE
SALINE CHEZ LE MUTANT D’A.*THALIANA*
*p5cs1-4***

CHAPITRE III

Caractérisation physiologique et biochimique de la réponse au sel d'un mutant d'*Arabidopsis thaliana p5cs1-4* déficient dans la synthèse de la proline.

1. Introduction

L'accumulation de la proline est l'un des traits adaptatifs fréquemment observés chez les plantes en réponse à diverses contraintes environnementales. Le rôle attribué à la proline dans la réponse des plantes à ces contraintes demeure encore controversé. Une étude récente de Székely *et al.* (2008) a montré que le mutant nul d'*A. thaliana p5cs1-4* déficient dans l'accumulation de la proline, est hypersensible à la contrainte saline.

2. Objectifs

Afin de mieux déterminer le rôle de la proline chez *A. thaliana*, en réponse à la contrainte saline, nous évaluons ici l'impact à long terme de la contrainte saline chez le mutant *p5cs1-4*. On s'est fixé pour principal objectif de diagnostiquer les bases de la sensibilité particulière de ce mutant à la contrainte saline par rapport à l'écotype sauvage. Nous visons également la vérification si l'apport exogène de la proline pourrait avoir une fonction protectrice chez ces plantes.

3. Méthodologie

Les graines d'*A. thaliana* d'écotype sauvage (Col-0) et du mutant *p5cs1-4* sont semées directement sur un mélange sable:vermiculite (3:1) dans des petits pots puis sont recouverts avec des pots en plastique transparent pendant une semaine et sont placés dans une serre vitrée (300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ radiation photosynthétique active, température $25\pm 5^\circ \text{C}$, humidité relative $60\pm 10\%$) au Laboratoire des Plantes Exptrémophiles (LPE de Borj Cedria). Les plantules sont arrosées régulièrement avec de l'eau pendant la première semaine puis avec la solution nutritive Hewitt (1960) diluée 10 fois. Après deux semaines de prétraitement, une récolte de départ a été effectuée. Ensuite, les plantes de chaque génotype ont été divisées en

quatre lots, deux lots servent de témoin, les deux autres sont traitées par 100 mM NaCl. Des pulvérisations d'une solution de proline (10 mM), à l'aide d'un pulvérisateur, ont été réalisées sur les feuilles de l'un des lots des plantes témoins et celles de l'un des lots de plantes traitées). Un arrosage tous les deux jours avec la solution nutritive de base diluée 4 fois additionnée ou non de NaCl et des pulvérisations à la proline ont été opérées. La récolte finale est réalisée au bout de 10 jours de traitement. A la récolte, les plantes issues de l'expérience de pulvérisation avec la proline sont lavées soigneusement avec de l'eau distillée et utilisées pour les différents dosages. Certains paramètres physiologiques et biochimiques ont été étudiés, y compris l'activité de la croissance des plantes, le statut hydrique des feuilles, l'activité photosynthétique, la sélectivité Na^+ / K^+ , et la capacité antioxydante.

4. Résultats

L'apport de sel dans le milieu de culture, réduit de manière significative l'activité de la croissance chez les deux génotypes et, en particulier chez le mutant *p5cs1-4*. Ceci est accompagné d'une diminution significative de l'activité photosynthétique, de fluorescence chlorophyllienne et de la teneur en chlorophylles. En condition de contrainte saline, aucune différence n'est observée entre les deux génotypes tant au niveau de l'hydratation des feuilles qu'au niveau du rapport Na^+ / K^+ , ce qui suggère que l'hypersensibilité du mutant au sel n'est pas due à la perturbation de l'absorption de l'eau ou de l'homéostasie Na^+ / K^+ . En réponse à 100 mM NaCl dans le milieu de culture, le mutant *p5cs1-4* montre des niveaux élevés d'accumulation des ERO qui sont supérieurs à ceux des plantes sauvages, concomitante à une faible induction des enzymes antioxydantes. La pulvérisation foliaire de la proline sous contrainte saline améliore la capacité antioxydante chez le mutant *p5cs1-4* et rétablit sa croissance ainsi que son activité photosynthétique.

5. Conclusion

L'ensemble de ces résultats nous ont permis de montrer que la sensibilité particulière du mutant *p5cs1-4* est liée à sa capacité limitée de faire face au stress oxydatif généré par la salinité et de protéger ses organes photosynthétiques contre les ERO. Ces données fournissent des preuves supplémentaires quant au rôle de la proline dans le système de défense

antioxydant. Ces données ont fait l'objet d'un manuscrit intitulé " *Exogenous application of proline partially restores growth, photosynthetic and antioxidant capacity of the proline-deficient p5cs1-4 Arabidopsis thaliana mutant upon salt stress*" en cours d'évaluation par la revue Journal of Plant Growth Regulation.

6. Article 3:

Exogenous application of proline partially restores growth, photosynthetic and antioxidant capacity of the proline-deficient *p5cs1-4 Arabidopsis thaliana* mutant upon salt stress

Kilani Ben Rejeb^{a,b,1,*}, Maâli Benzarti^{a,1}, Ahmed Debez^a, Arnould Savouré^b, Chedly Abdelly^a

^aLaboratoire des Plantes Extrêmophiles, Centre de Biotechnologie de Borj-Cedria (CBBC), BP 901, Hammam-Lif, 2050, Tunisia.

^bAdaptation des plantes aux contraintes environnementales, UR5, Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Case 156, 4 Place Jussieu, 75252 Paris cedex 05, France.

Running title: salt sensitivity of proline deficient *A. thaliana* mutant

¹Both authors contributed equally to this work.

*Corresponding author: Kilani Ben Rejeb, Email: kilanib@yahoo.com

Tel. (+216) 79 325 848 Fax (+216) 79 325 638

Key words: Antioxidant, *Arabidopsis thaliana* proline-deficient mutant (*p5cs1-4*), exogenous proline, hypersensitivity, salt stress.

Abbreviations: $^1\text{O}_2$, singlet oxygen; A, Net photosynthetic rate; APX, ascorbate peroxidase; CAT, catalase; Chl, Chlorophyll; C_i , intracellular CO_2 concentrations; F_v / F_m , maximum quantum efficiency of PSII photochemistry; GFP, green fluorescent protein; Glu, glutamate; GR, glutathione reductase; g_s , stomatal conductance; H_2O_2 , hydrogen peroxide; MDA, malondialdehyde; NADP, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; $\text{O}_2^{\cdot-}$, superoxide anion; P5C, pyrroline-5-carboxylate; P5CDH P5C dehydrogenase, P5CR, pyrroline-5-carboxylate reductase; P5CS, pyrroline-5-carboxylate synthetase; Pro, Proline; ProDH, Pro dehydrogenase; RGR, t relative growth rate; ROS, reactive oxygen species; RWC, relative water content; SOD, superoxide dismutase; ψ_s , osmotic potential; Φ_{PSII} , relative quantum yield of PSII.

Abstract

Responses of *Arabidopsis thaliana* wild-type and proline deficient *p5cs1-4* mutants were compared upon their exposure for 10 d to either 0 or 100 mM NaCl and the external addition of 10 mM proline as leaf spray. In the absence of proline, salt-treated plants of both *A. thaliana* genotypes showed significant growth restriction compared to control, with a more marked effect for the *p5cs1-4* mutant. This was concomitant with a significant decrease in the photosynthetic activity assessed by gas exchanges, chlorophyll a fluorescence and chlorophyll content. No significant differences were observed in the leaf water status and Na^+/K^+ ratio between salt-treated wild-type and *p5cs1-4* seedlings, suggesting that the salt hypersensitivity of the mutant was not due to the disruption of water uptake or Na^+/K^+ homeostasis. Upon salt stress, *p5cs1-4* mutant showed significantly higher leaf H_2O_2 and malondialdehyde (MDA) contents together with significantly lower activities of ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) and glutathione reductase (EC 1.6.4.2). Hence, the lower efficiency of *p5cs1-4* plants to cope with the oxidative stress imposed by salinity and its harmful effect on photosynthesis may provide reasonable arguments for the hypersensitivity of this mutant to salt stress. Proline supply mitigated the negative impact of salinity on the plant growth and the photosynthetic activity by improving the antioxidant capacity in this mutant. Altogether our data provide further evidence that proline plays an important role in the antioxidant defense system.

Introduction

Proline (Pro) accumulation is one of the most frequent metabolic responses observed in a wide number of plant species in response to adverse environmental constraints. A number of possible functions have been proposed for stress-induced Pro accumulation. Pro was notably proposed to act as stabilizer for proteins and macromolecular complexes, scavenger of free radicals and regulator of cellular redox potential (Ben Rejeb and others 2012). Under osmotic stress condition, Pro is synthesized mainly from glutamate (Glu) (Szabados and Savaure 2010). In this pathway, Glu is converted to Pro by two successive reductions catalyzed by pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) and pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR). In mitochondria, the catabolic pathway of Pro involves the consecutive action of Pro dehydrogenase (ProDH) that produces pyrroline-5-carboxylate (P5C) and P5C dehydrogenase (P5CDH) that oxidizes P5C to Glu. The rate limiting steps in Pro biosynthesis and degradation in *Arabidopsis* are catalyzed by P5CS and ProDH, respectively. The overexpression of the P5CS-encoding gene in transgenic tobacco plants has been shown to increase Pro production and to confer tolerance to osmotic stress, corroborating that P5CS is of key importance for the biosynthesis of Pro in plants (Kavi Kishor and others 1995). In *Arabidopsis*, two closely related *P5CS* genes have been identified. *AtP5CS1* is inducible by drought and salt stress (Savaure and others 1995; Yoshida and others 1995), whereas *AtP5CS2* is described as housekeeping gene active in dividing tissues. By using transgenic *A. thaliana* expressing either *P5CS1* or *P5CS2* fused with green fluorescent protein (GFP), Székely and others (2008) have shown that under normal growth conditions, P5CS1-GFP protein is localized in the cytosol, and osmotic stress stimulates P5CS1-GFP protein import into chloroplasts. However, P5CS2-GFP was assumed to be a cytosolic enzyme.

Pro accumulation in plants under stress conditions is a result of the reciprocal regulation of the biosynthetic and catabolic pathways. A positive correlation between the capacity for Pro accumulation and dehydration tolerance has been reported in many biological systems. Some halophytic species such as *Sesuvium portulacastrum* (Slama and others 2006) and *Cakile maritima* (Megdiche and others 2009) accumulates high level of Pro. This behavior is concomitant with osmoregulatory capacity when these halophytic species are subject to either salt stress or drought. *Thellungiella salsuginea*, which had previously been named *T. halophila*, has become a model plant to study the genetic basis of halophytic plant tolerance. This plant species, accumulates Pro constitutively. Its ability to tolerate extremely

high levels of NaCl (survival to more than 500 mM NaCl) is correlated with hyperaccumulation of Pro, resulting from an increase in *P5CS* transcript levels and a decrease in those of *ProDH*. Although inter- and intraspecific differences in Pro accumulation have been identified in plants and the ability to hyperaccumulate Pro accompanies the extremophile traits of several plants. Some data suggest that Pro accumulation is rather a symptom of sensitivity. For example, Liu and Zhu (1997) showed that the *Arabidopsis sos1* mutant affected in Na^+/H^+ antiporter is hypersensitive to the presence of NaCl while it shows Pro levels two-fold higher than wild type. *eskimo1* mutant, which also hyper-accumulates Pro, is less tolerant to water deficit stress and salinity than *Arabidopsis* wild-type (Ghars and others 2008). Taken together, these data suggest that the role of Pro in osmotolerance is closely related to the plant species that have been investigated. Therefore, the exact role of this metabolite in plants needs to be determined.

In a recent study Székely and others (2008) reported that knock-out proline deficient *p5cs1-4 Arabidopsis* plants treated with 200 mM NaCl for 24 h in hydroponic culture medium were hypersensitive to salinity stress. In the *p5cs1-4* mutants, higher level of reactive oxygen species (ROS) and lower activities of enzymes involved in the ascorbate-glutathion cycle than those in wild-type were observed. In order to better understand the secondary stress responses in these mutants, we addressed here the impact of long-term salt-stress on the *p5cs1-4* plants and evaluated whether exogenously added Pro might have a protective function in stress plants. Physiological and biochemical parameters such as plant growth activity, leaf water status, photosynthetic activity, leaf Na^+/K^+ content and the oxidative stress leaf responses were investigated in the *p5cs1* mutant.

Materials and Methods

Growth conditions and stress treatments

Seeds of wild type *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia (Col-0)) and *p5cs1-4* mutant (Székely and others 2008) were sown at a density of two plants per pot containing a mixture of vermiculite:sand (1:3). Seedlings were irrigated with one-quarter-strength Hewitt (1966) nutrient solution under greenhouse conditions ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Photosynthetic Active Radiation (PAR); 16/8h light/dark cycle; $25 \pm 5^\circ\text{C}$ temperature; $60 \pm 10\%$ relative humidity). Four week-old plants at rosette stage were exposed for 10 days to either 0 or 100 mM NaCl

(four pots per treatment). Another group of plants was used to evaluate the effect of exogenous sprayed 10 mM Pro in absence or presence of 100 mM NaCl under the same conditions described above.

Growth, relative water content (RWC) and osmotic potential (ψ_s)

Plant relative growth rate (RGR) was determined according to Beadle (1993) as follows:

$$\text{RGR} = \ln (W_2/W_1)/t_2-t_1$$

Where W is the total dry weight, t is the time, and 1 and 2 are the beginning and the end of stress period, respectively.

Leaf relative water content was estimated by recording the turgid weight which represents fully hydrated leaf weight by keeping them in water for 24 h, followed by their drying in hot air oven till constant weight was reached (Ben Amor and others 2005). The following equation was used for determining RWC (%) = $(FW-DW) / (TW-DW) \times 100$

Where TW stands for turgid weight, FW fresh weight and DW dry weight.

Osmotic potential (ψ_s) was determined with a vapor pressure osmometer (Osmomat 030, Genotec, Berlin, Germany) using sap extracts from fresh leaves tissues. Osmolarity (c) was expressed as MPa using the formula $\psi_s = c \times 2.58 \times 10^{-3}$ according to the Van't Hoff equation (Martinez and others 2004).

Gas exchange and chlorophyll fluorescence measurements

Net photosynthetic rate (A), stomatal conductance (gs) and intracellular CO₂ concentrations (Ci) were determined with a portable photosynthesis system (LCA4). Chlorophyll fluorescence was measured using a modulated chlorophyll fluorimeter (OS1-FL). Leaves previously selected for the measurement of photosynthetic gas exchange were used for fluorescence measurements following the procedure described by Genty and others (1989). The minimal (F_0) and maximal (F_m) Chl a fluorescence were assessed in leaves after 20 min of dark adaptation. The maximum quantum efficiency of PSII photochemistry was calculated

as $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$. The relative quantum yield of PSII at steady-state was calculated as $\Phi_{PSII} = (F'_m - F_s)/F'_m$, where F_s and F'_m are fluorescence at steady-state and maximum fluorescence in the light, respectively.

Leaf chlorophyll and ion concentrations

Chlorophyll was extracted from 100 mg leaf FW in 5 ml 100% acetone. After centrifugation for 5 min at 500 g, extract absorbances were measured at 470, 645, and 662 nm. Concentrations of total Chl were calculated as given by Lichtenthaler (1987). After ion extraction from dried ground leaf in 0.5% HNO₃, Na⁺ and K⁺ was assayed by flame emission photometry (Corning, UK).

Pro determination

Free Pro contents were measured according to the method of Bates and others (1973). Fresh leaves (0.1 g) were extracted in 1.5 ml of 3% sulfo-salicylic acid. Then, 1 ml of the filtrate was mixed with 1 ml of acid ninhydrin followed by 1 ml of glacial acetic acid. All samples were incubated at 100° C for 60 min, cooled in an ice bath, and 2 ml of toluene was added to the solution and mixed vigorously. The chromophore-containing toluene was aspirated and the absorbance read at 520 nm. Pro concentration in the samples was determined from a standard curve and calculated on fresh weight basis.

H₂O₂ content measurements

H₂O₂ content was determined spectrophotometrically following the protocol described by Oracz and others (2009). 300 mg fresh weigh plant materials were ground in a mortar on ice in 1 ml perchloric acid (0.2 M). After 15 min of centrifugation at 13,000 g at 4°C, the resulting supernatant was neutralized to pH 7.5 with 4 M KOH and then centrifuged at 13,000 g at 4°C. The supernatant was immediately used for spectrophotometric determination of H₂O₂ using a horseradish peroxidase-based assay with 3-dimethylaminobenzoic acid and 3-methyl-2-benzothiazolidone hydrazone. The increase in absorbance at 590 nm was monitored

for 15 min after the addition of peroxidase at 25°C and analyzed using a calibration curve obtained with known amounts of fresh H₂O₂.

Enzyme extraction and assays

For CAT (EC 1.11.16), GR (EC 1.6.4.2) and SOD (EC 1.15.11) activities, frozen leaf materials (0.3 g) were homogenized in 5 ml of a potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.8) containing 2 mM dithiothreitol, 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1.25 mM polyethylene glycol 4000 and 10% (w/v) of polyvinylpolypyrrolidone (PVP). For APX (EC 1.11.1.11) activity, leaf material was homogenized in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 1 mM ascorbate (Asc), 0.1 mM EDTA, and 1% (w/v) PVP. The homogenate was then centrifuged for 30 min at 14,000xg and the supernatant was desalted on a PD 10 column (Amersham Biosciences, Sweden). All steps of the extraction procedure were carried out at 4°C. Protein contents of the extracts were determined using the Bio-Rad protein assay kit with bovine serum albumin as calibration standard. The total activities of antioxidant enzymes were determined according to Bailly and others (1996). Total SOD activity was assayed by monitoring the inhibition of photochemical reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) (Giannopolitis and Ries, 1977). The reaction mixture (3 ml) contained 0.1 M tampon phosphate (pH 7.8), 13 mM L-methionine, 63 µM NBT, 1.3 µM riboflavin, and 50 µL of enzyme extract. Riboflavin was added last and the test tubes containing reaction mixture were incubated for 15 min under a light source of 500 W fluorescent lamps at 25°C. The increase in absorbance due to formazan formation was read at 560 nm. The reaction mixture with noenzyme developed maximum color because of the maximum rate of reduction of NBT. Non-irradiated reaction mixture was used as the control since not developing color. One unit of SOD activity was defined as the amount of enzyme that was required to cause 50% inhibition of the reduction of NBT. Total CAT activity was assayed by measuring the decomposition rate of H₂O₂ at 240 nm. The enzyme assay contained 2.55 ml of 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) and 200 µl of enzyme extract. GR activity was determined at 25°C (Esterbauer and Grill 1978) by following the rate of NADPH oxidation at 340 nm. The assay mixture contained 0.5 mM NADPH, 10 mM oxidized glutathione, 3 mM MgCl₂ in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.8), and 100 µl of enzyme extract in a total volume of 400 µl. APX activity was measured according to Nakano and Asada (1981). The enzyme assay

contained 0.5 mM ascorbate, 0.4 mM H₂O₂ in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), and 50 µl of enzyme extract in a total volume of 1 ml. APX activity was determined by following the decrease of ascorbate absorbance at 290 nm.

Results

Plant growth, leaf water status

No difference was observed in the growth activity expressed as RGR between wild-type and *p5cs1-4* seedlings upon salt-free growth conditions (Table 1). Salt exposure led to a significant restriction of RGR in both genotypes but this negative impact was more pronounced in *p5cs1-4* than in wild-type plants (-51% and -38% as compared to their respective control, respectively). Interestingly, the exogenous application of 10 mM Pro resulted in a significant improvement of the growth activity in both salt-stressed genotypes, since RGR values were restored to up to 84% and 88% of the control in wild-type and *p5cs1-4* mutant, respectively. Wild-type and *p5cs1-4* mutants showed close leaf RWC values in the absence of salt (Table 1). This parameter was similarly impacted by 10 day-long exposure to 100 mM NaCl in both genotypes with a 20% reduction as compared to the respective control. Unlike for growth activity, salt effect on leaf hydration was not alleviated by Pro addition since RWC values were unaffected in both salt-stressed genotypes. Leaf osmotic potential of wild-type and *p5cs1-4* seedlings was comparable under control conditions and decreased to the same extent (*ca.* 1.8-fold) following salt treatment in wild-type and *p5cs1-4* plants (Table 1).

Leaf Pro accumulation and Na⁺/K⁺ relationship

Under salt-free conditions, leaf Pro concentration was similar in both genotypes whether supplied or not with Pro (Table 2). In absence of Pro spray, salt treatment led to a strong accumulation of Pro in wild-type plants (20-fold increase compared to control) whereas as expected, *p5cs1-4* plants accumulated much lower Pro as compared to wild-type under salt stress. The same trend was observed under Pro exogenous application with much higher extent in the mutant as compared to the wild-type (eight-fold and two-fold increase as compared to NaCl treatment respectively). It is noteworthy that in the mutant, Pro

concentration was almost restored to that of the wild-type seedlings grown at 100 mM NaCl without Pro addition (8.35 and 10.5 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW respectively) (Table 2).

Under control conditions, no significant differences were observed in leaf Na^+ and K^+ concentrations in both genotypes (Table 2). Growing plants with 100 mM NaCl resulted in a significant increase of leaf Na^+ concentrations in wild-type and mutant plants (+ 7-fold as compared to their respective control) which was concomitant with a significant decrease in leaf K^+ concentrations (-30% on average in both genotypes as compared to their respective control). Consecutively, Na^+/K^+ ratio values were significantly higher in salt-stressed plants than in control plants and no significant differences between both genotypes. Pro external application upon either 0 or 100 mM NaCl had no significant effect on leaf Na^+ and K^+ status in both genotypes (Table 2).

Photosynthetic performance

Salt stress caused a significant decrease of the net photosynthetic rate (A) and stomatal conductance (g_s) in both genotypes (Figs. 1A and B). However in comparison to their respective controls, the salt-induced reduction of A and g_s was more pronounced in *p5cs1-4* than in wild-type plants (-54% and -40% respectively). Interestingly, the decrease in A and g_s was mitigated by the application of 10 mM Pro in both genotypes. The intracellular CO_2 concentration (C_i) was comparable for the control of both genotypes before decreasing significantly and similarly upon exposure to salt (Fig. 1C). Pro addition resulted in a significant enhancement of C_i in both genotypes to reach a similar level.

Maximal efficiency of PSII photochemistry (F_v / F_m) was close to 0.84 in wild-type and to 0.78 in the *p5cs1-4* mutant (Fig. 2A). Both F_v / F_m and the relative quantum yield of PSII (Φ_{PSII}) were significantly lower in salt-stressed *p5cs1-4* plants, whereas these parameters were less impacted by salinity in wild-type (Figs. 2A and 2B respectively). Pro application restored F_v / F_m and Φ_{PSII} parameters of the salt-stressed *p5cs1-4* mutant close to the control ones. The total Chl concentration decreased significantly in the salt-treated wild-type and *p5cs1-4* mutant with a more marked impact for the latter (-33% in the wild-type and -60% in the *p5cs1-4* mutant as compared to their respective controls) (Fig. 2C).

Oxidative stress and ROS-scavenging enzyme activities

Leaf H₂O₂ and malondialdehyde (MDA) concentrations were significantly higher upon salt treatment in both genotypes (Figs. 3A and 3B respectively). This trend was however more pronounced in *p5cs1-4* mutant (6-fold and 3.8-fold increase for H₂O₂ and MDA concentrations) as compared to wild-type (4-fold and 2-fold increases for H₂O₂ and MDA concentrations). Pro addition efficiently lowered the salt-induced oxidative stress as reflected by the significant reduction of both H₂O₂ and MDA leaf concentrations. This was particularly true for the *p5cs1-4* mutant (Figs. 3A and 3B). Salt stress increased significantly CAT, APX, and GR activities in both wild-type and *p5cs1-4* mutants as compared to their respective controls (Figs. 4A, C and D). APX and GR activities measured in salt-treated wild-type plants were higher than for the *p5cs1-4* mutant but the latter genotype displayed higher CAT activity. No significant effect of salinity on SOD activity was observed in both genotypes which showed very similar values (Fig. 4B). Pro exogenous application under saline conditions resulted in a significant increase of leaf APX and GR activities in both genotypes whereas no significant changes occurred for SOD activity. Concerning CAT activity, it was significantly lower in *p5cs1-4* mutant in contrast to the wild-type where it remained constant.

Discussion

The ability to accumulate Pro in response to environmental stresses is regarded as one of the protective mechanisms allowing plants to survive under unfavorable environment (Hayat and others 2012). Werner and Finkelstein (1995) found that a Pro deficient *Arabidopsis* mutant, selected for its ability to germinate on 150 mM NaCl, was unable to growth in the presence of salt. Brugiére and others (1999) showed that the expression of antisense Glu synthetase reduced Pro production making transgenic *Arabidopsis* more sensitive to salt treatment. More recently, lower salt tolerance was also observed in the *p5cs1-4* insertion mutant of *Arabidopsis* with impaired Pro accumulation (Székely and others 2008). According to the present study, both of the wild-type and *p5cs1-4* mutant plants growing under salt-free conditions showed comparable growth activity whereas *p5cs1-4* mutant was more salt sensitive than the wild-type when challenged for 10 d with 100 mM NaCl (Table 1). This finding further confirms that *p5cs1-4* mutant is hypersensitive to salt stress, as already reported by Székely and others (2008). The osmoprotective effect provided by the supply of

Pro has often been documented for plants under stress conditions (Ashraf and Foolad 2007). Pro addition under optimal growth conditions has been shown to negatively affect chloroplast and mitochondria (Hare and others 2002), to inhibit seedling growth (Chen and others 2011), and to trigger programmed cell death (Deuschle and others 2004) in *Arabidopsis*. Unlike these reports, our data revealed that treatment with 10 mM Pro had not only no toxic effect in *A. thaliana* plants growing in absence of salt but also could improve the growth of *p5cs1-4* mutant when challenged with salt stress. The growth promoting effect due to exogenous Pro in NaCl-treated *p5cs1-4* mutant is consistent with a previous study on transgenic *Arabidopsis* expressing an antisense *P5CS* that reduces the Pro level (Nanjo and others 1999). Authors showed that these plants were unable to grow on saline media and that L-Pro addition, but not D-Pro, increased their ability to cope with salt.

The decline in growth observed in many plants under salinity condition is generally associated with several physiological actions including ion toxicity, osmotic stress, and reactive oxygen species (ROS) accumulation (Munns and Tester 2008). Salinity affects plant growth primarily by increasing the cellular concentration of Na^+ to toxic levels and restricting the nutrient uptake. No significant differences in the Na^+/K^+ ratio levels among wild-type and *p5cs1-4* plants under salt stress were observed (Table 2), suggesting that the salt hypersensitivity of *p5cs1-4* was not due to the disruption of Na^+/K^+ homeostasis. In salt-treated melon plants, the beneficial effect of Pro addition was shown to result from a reduction in Na^+ contents (Kaya and others 2007), suggesting that alleviating the deleterious effects of salt on growth by exogenous Pro can be related to a reduction in sodium uptake. Data inferred from the present study do not support this assumption since no diminution in leaf Na^+ concentration was observed when salt-stressed *A. thaliana* wild-type and *p5cs1-4* plants were treated with Pro.

Despite this discrepancy, several reports indicate that Pro accumulation is correlated with abiotic stress tolerance (Ben Rejeb and others 2012). This is related to the fact that Pro acts as a compatible solute, which is involved in the osmotic adjustment process. In transgenic tobacco plants overexpressing a *P5CS* gene from *Vigna aconitifolia*, a relationship between osmotic adjustment, plant growth and Pro accumulation was found for the salt-challenged plants (Kavi Kishor and others 1995). The concentration of Pro is not always high enough to adjust the osmotic potential in some plants under stress, which makes the contribution of this amino acid relatively secondary in the osmotic adjustment process. This seems to be

corroborated by the present study since there was no significant difference in water relation parameters (leaf RWC and leaf osmotic potential) between wild-type and *p5cs1-4* plants during salt stress (Table 1) despite higher Pro accumulation observed in wild-type than in *p5cs1-4*. Hence, Pro might play another role that cytoplasmic osmotic adjustment at least in *A. thaliana*. Okuma and others (2004) ascribed the improvement of growth of salt-stressed tobacco cell culture by exogenous Pro to its role as an osmoprotectant for enzymes and membrane against salt inhibition rather than as a compatible solute.

Under salt stress conditions, Na^+ and Cl^- accumulation impairs biochemical as well as photochemical processes of photosynthesis (Munns and Tester 2008), as a result of the stomatal closure or other metabolic impairment. A significant reduction of *A* and *g_s* was observed (Fig. 1) in salt treated *A. thaliana* wild-type and *p5cs1-4* plants, with a more negative effect for the latter. The salt-induced reduction of the photosynthetic activity in *p5cs1-4* plants with lower levels of Pro did not result from stomatal limitations, since *C_i* values were similar to those registered for the wild-type, but likely from non-stomatal limitations which include the inhibition of the key enzyme activities in the Calvin cycle, the photosynthetic electron transport chain and the RuBisCo activity (Delfine and others 1998). Exogenous application of Pro increased the *C_i*; however *C_i* value measured in *p5cs1* with low Pro levels is similar to wild-type. So increase of *C_i* might be a consequence of water addition rather than the Pro itself (Hameed and others 2012). In our study, Pro appears to be directly involved in the protection of the photosynthetic apparatus, as suggested by the higher Chl concentration and *A* values recorded in wild-type compared with those in *p5cs1-4* upon stress. In addition a positive effect of exogenous Pro was observed in net photosynthetic rate (*A*) of salt-treated *p5cs1-4*. Several authors have reported that exogenous Pro is able to offset the decrease in photosynthesis in a variety of plants under various stress (Shaddad 1990; Ben Ahmed and others 2010). Pro may maintain the photosynthetic not only through increasing stomatal conductance but also by maintaining the stability of membrane and protein conformations such as RuBisCo under stress conditions (Solomon and others 1994; Szabados and Saviouré 2010). Interestingly in a recent study, Zhao *et al.* (2013) showed that the ABA and NaCl stress induced *AtGALK2* is a key component of ABA signaling. These authors reported that *AtGALK2* mutants were more salt- and ABA-tolerant than the wild-type ecotype. The better behavior of the mutant plants was notably associated with higher Pro content and higher stomata aperture degree. These findings provide indirect support for our data showing

that *p5cs1-4* plants (salt-hypersensitive in our case) accumulated lesser Pro and showed lower stomatal conductance compared to wild-type. Another likely explanation for the beneficial effect of Pro accumulation on stomatal conductance may be related to the role of Proline as a compatible solute involved in cell osmotic adjustment (OA) and the protection of cell components upon plant exposure to water deficit or salinity (Szabados and Saviouré 2010). Osmotic adjustment helps to maintain cell turgor, which allows cell enlargement during water stress, and thereby allows stomata to remain at least partially open and CO₂ assimilation to continue at water potentials that would be otherwise inhibitory (Alves and Setter 2004).

Lower carbon assimilation during salt stress coupled with the decreases in NADPH consumption by the Calvin cycle leads to an increase in excitation energy which accumulates within chloroplasts. The excess excitation energy results in an increase in the singlet and triplet forms of Chl and singlet oxygen ¹O₂, and causes an increase in the rate of electron flow from the donor side of PSI to oxygen, accompanied by the generation of ROS such as superoxide anion (O₂^{•-}) and hydrogen peroxide (H₂O₂). These ROS are strongly reactive because they can interact with essential macromolecules and metabolites causing cellular damages (Gill and Tuteja 2010). Chl fluorescence and MDA accumulation can be used as reliable indicative parameters to evaluate the severity of damages caused by ROS (Benzarti and others 2012). The maximal photochemical efficiency of PSII (F_v/F_m) is a parameter that allows the detection of any damage to the PSII and the possible occurrence of photoinhibition (Maxwell and Johnson 2000). We found that both F_v/F_m and Φ_{PSII} declined to a higher extent in salt-stressed *p5cs1-4* plants (Figs. 2B and 2C), indicating that these plants suffered of photoinhibition when salt-challenged. The stronger impact of salinity observed on the PSII functional integrity of the mutant plants could also be explained by the degradation of protein subunits and PSII resulting in the inactivation of PSII reaction centers (Murata and others 2007). Interestingly, Signorelli and others (2013b) recently reported lower F_v/F_m and reduced content of the protein D2 in lotus plants simultaneously challenged with drought and heat stresses, strongly suggesting the presence of a disassembling process of this PSII subunit. Measurement of MDA concentration in wild-type and *p5cs1-4* mutant during salt stress treatment showed that wild-type plants accumulated much more Pro while accumulating lesser MDA than *p5cs1-4* mutant (Fig. 3). More importantly, exogenous Pro improved the performance of PSII and reduced MDA content in *p5cs1-4* plants. Hence, these findings provide reasonable arguments for a possible role of Pro in reducing oxidative damage in plant

cells exposed to salinity. A negative relationship between Pro and lipid peroxidation was also detected in transgenic sugarcane overexpressing the *Vigna aconitifolia* *P5CSF129A* gene (Molinari and others 2007). Transgenic algae expressing *P5CS* gene accumulated more Pro than the wild-type and the Pro concentrations negatively correlated with MDA contents in heavy metal-treated algae (Siripornadulsil and others 2002). Stress-inducible Pro accumulation might therefore act as a component of an antioxidative defence system to counteract the deleterious effects of oxidative stress.

The lower resistance of the photosynthetic apparatus to oxidative stress in *A. thaliana* mutant as compared to the wild-type could be related to direct and/or indirect metabolic and/or physiological consequence of a deficit in Pro accumulation. Indeed, this osmolyte has been suggested to play a vital role in reducing the photodamage in the thylakoid membranes (Alia and others 1991). In addition, Pro could be involved in the regulation of the cellular $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ ratio. Recently it has been proposed that Pro may be synthesised from glutamate in chloroplasts (Székely and others 2008) which requires the oxidation of two NAD(P)H molecules to NAD(P)^+ , a likely way of recycling NAD(P)^+ under stress. By restoring the pool of the terminal electron acceptor of the photosynthetic electron transport chain, Pro synthesis may lower ROS production and provide some protection against photoinhibition under salt stress conditions. Hebbelmann and others (2012) reported that the *Arabidopsis* knockout mutants lacking a chloroplast NADP-dependent malate dehydrogenase (*nadp-mdh*) do not use excess reducing equivalents in the Calvin cycle for carbon assimilation in response to high-light treatment. These *nadp-mdh* knockout mutants use a combination of compensatory strategies to maintain redox homeostasis and dissipate excess reducing equivalents, by adjusting photorespiration and increasing Pro biosynthesis, thereby sustaining photosynthesis and preventing photoinhibition (Hebbelmann and others 2012). In addition to its role for buffering cellular redox potential under stress conditions, Pro has been proposed to contribute to free radical scavenging. Smirnoff and Cumbes (1989) have first shown that Pro was an effective hydroxyl radical scavenger. Later, Alia and others (2001) and Matysik and others (2002) proposed that Pro could deactivate $^1\text{O}_2$ by physical quenching. Yet, recent evidence that Pro cannot quench $^1\text{O}_2$ in aqueous buffer (Signorelli and others 2013a) may lead to reconsider the assumption about a likely scavenging role of Pro against $^1\text{O}_2$ in plants under stress. The role of Pro in plant responses to oxidative stress has also been demonstrated extensively in experiments in which either exogenous Pro was applied (Hoque and others

2007; Ozden and others 2009) or Pro synthesis or degradation was genetically engineered (Hong and others 2000; Kocsy and others 2005; Molinari and others 2007). It was expected that up-regulation of the components of the antioxidant system offered by Pro protects plants against heavy metals (Aggarwal and others 2011), oxidative stress (Sorkheh and others 2012), and NaCl-induced oxidative damage (Ben Ahmed and others 2010). Our results show that CAT, APX and GR activities increased significantly in NaCl-stressed wild-type plants as compared to control. This was enhanced by exogenous Pro supply. In *p5cs1-4* mutant, significantly lower activities of APX and GR were recorded under NaCl stress conditions as compared to wild-type. However a stronger increase in CAT was observed in this mutant. Rizhsky and others (2002) reported that a deficiency in APX resulted in the induction of CAT, suggesting that these enzymes were induced to compensate for APX suppression. The fact that *p5cs1-4* mutant accumulates higher H₂O₂ and MDA levels than wild-type plants suggests that the observed increase in CAT levels is likely not sufficient to compensate for the lower activity of the detoxifying AsA-GSH cycle (Székely and others 2008). The positive relationship among the antioxidant enzymes activities and Pro accumulation reinforces the hypothesis of Schobert and Tschesche (1978), suggesting chaperone properties for Pro. The latter is an amphoteric compound and can interact with both hydrophilic and hydrophobic domains of macromolecules (Chadalavada 1994) to stabilize the quaternary structure and maintain their functions. Pro protection against oxidative stress may hence involve the enhancement and stabilization of antioxidant enzymes.

In summary, the Pro-deficient mutant *p5c1-4* is more sensitive to long-term salt stress than wild-type plants mainly due to the aggravated oxidative stress and altered photosynthetic activity, whereas K⁺ vs. Na⁺ selectivity and leaf water relations were similar in wild-type and *p5cs1*. Exogenously applied Pro appeared to be beneficial especially on the salt-challenged *p5cs1-4* plants by notably mitigating the salt-induced PSII photoinhibition through maintaining the anti-oxidative enzyme activities to avoid or mitigate photooxidation. Altogether our data provide further evidence that Pro plays an important role in the activation of the antioxidant system. Both Pro by itself and Pro metabolism have synergetic function in this process.

Acknowledgements

We are very grateful to Prof. László Szabados (Institute of Plant Biology, Biological Research Center, Szeged, Hungary) for providing seeds of *p5cs1-4* mutant. This work was supported by the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research (LR10CBBC02) and the Tunisian-French CMCU (Comité Mixte de Coopération Universitaire) network (13G0929). Part of this study was supported by European Union COST programs FA0605 and FA0901.

Table 1. Effect of exogenous 10 mM Pro on relative growth rate (RGR), relative water content (RWC), and leaf osmotic potential of *A. thaliana* wild-type and *p5cs1-4* mutant exposed for 10 d to 100 mM NaCl. Means ($n = 4 \pm \text{SE}$) with different letters are significantly different at $P < 0.05$.

		RGR (day^{-1})	RWC (%)	Ψ_s (MPa)
WT	Control	0.068 ± 0.001^c	90 ± 1.5^b	-0.80 ± 0.01^a
	Pro	0.064 ± 0.002^c	90 ± 1.4^b	-0.87 ± 0.02^a
	NaCl	0.042 ± 0.001^a	71 ± 1.2^a	-1.44 ± 0.02^b
	NaCl + Pro	0.057 ± 0.006^b	72 ± 2.6^a	-1.57 ± 0.01^b
<i>p5cs1-4</i>	Control	0.064 ± 0.001^C	90 ± 2.1^B	-0.79 ± 0.02^A
	Pro	0.066 ± 0.001^C	90 ± 1.5^B	-0.84 ± 0.01^A
	NaCl	0.031 ± 0.003^A	70 ± 1.2^A	-1.40 ± 0.01^B
	NaCl + Pro	0.056 ± 0.001^B	70 ± 2.0^A	-1.48 ± 0.02^B

Table 2. Effect of exogenous 10 mM Pro on Na⁺, K⁺ and Pro accumulation in leaves of *A. thaliana* wild-type and *p5cs1-4* mutant exposed for 10 d to 100 mM NaCl. Means (n = 4 ± SE) with different letters are significantly different at *P* < 0.05.

		Pro (μmol g ⁻¹ FW)	Na ⁺ (mmol g ⁻¹ DW)	K ⁺ (mmol g ⁻¹ DW)	Na ⁺ /K ⁺ ratio
WT	Control	0.55 ± 0.05 ^a	0.25 ± 0.03 ^a	1.02 ± 0.14 ^b	0.25 ± 0.01 ^a
	Pro	0.85 ± 0.03 ^b	0.27 ± 0.06 ^a	1.08 ± 0.04 ^b	0.25 ± 0.06 ^a
	NaCl	10.5 ± 0.11 ^c	1.76 ± 0.04 ^b	0.69 ± 0.01 ^a	2.52 ± 0.11 ^b
	NaCl + Pro	22.07 ± 1.03 ^d	1.73 ± 0.07 ^b	0.67 ± 0.02 ^a	2.58 ± 0.06 ^b
<i>p5cs1-4</i>	Control	0.51 ± 0.03 ^A	0.27 ± 0.02 ^A	1.02 ± 0.03 ^B	0.26 ± 0.01 ^A
	Pro	0.82 ± 0.04 ^B	0.28 ± 0.05 ^A	1.04 ± 0.14 ^B	0.28 ± 0.07 ^A
	NaCl	1.11 ± 0.03 ^C	1.88 ± 0.08 ^B	0.69 ± 0.04 ^A	2.71 ± 0.14 ^B
	NaCl + Pro	8.35 ± 0.03 ^D	1.73 ± 0.08 ^B	0.67 ± 0.01 ^A	2.58 ± 0.21 ^B

Captions of figures

Fig. 1. Effect of 10 mM exogenous Pro on photosynthesis in wild-type and *p5cs1-4 A. thaliana* mutant exposed to either 0 or 100 mM NaCl for 10 d. Net photosynthesis rate, A (A), stomatal conductance, g_s (B), and intracellular CO_2 concentrations, C_i (C). Mean ($n = 4 \pm \text{SE}$) with different letters were significantly different at $P < 0.05$.

Fig. 2. Effect of 10 mM exogenous Pro in maximum quantum efficiency of PSII photochemistry, F_v/F_m (A), relative quantum yield of PSII (B) and total chlorophyll (a + b) concentration (C) in leaves of wild-type and *p5cs1-4 A. thaliana* mutant exposed to either 0 or 100 mM NaCl for 10 d. Mean ($n = 4 \pm \text{SE}$) with different letters were significantly different at $P < 0.05$.

Fig. 3. Effect of 10 mM exogenous Pro in H_2O_2 and MDA concentrations in leaves of wild type and *p5cs1-4 A. thaliana* mutant exposed to either 0 or 100 mM NaCl for 10 d. Mean ($n = 4 \pm \text{SE}$) with different letters were significantly different at $P < 0.05$.

Fig. 4. Effect of 10 mM exogenous Pro in antioxidant enzymes activities in leaves of wild type and *p5cs1-4 A. thaliana* mutant exposed to either 0 or 100 mM NaCl for 10 d. Mean ($n = 9 \pm \text{SE}$) with different letters were significantly different at $P < 0.05$.

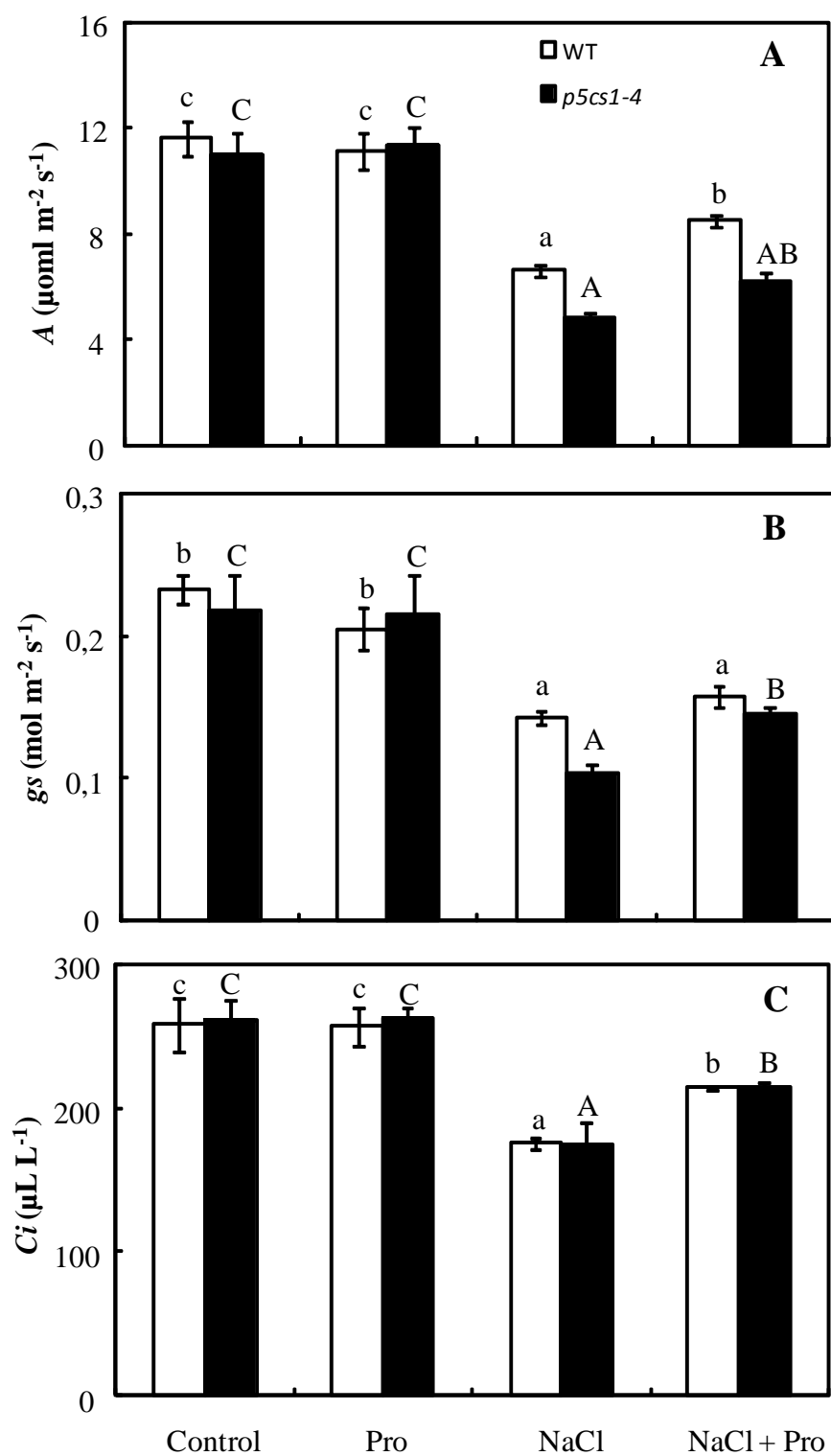


Fig.1.

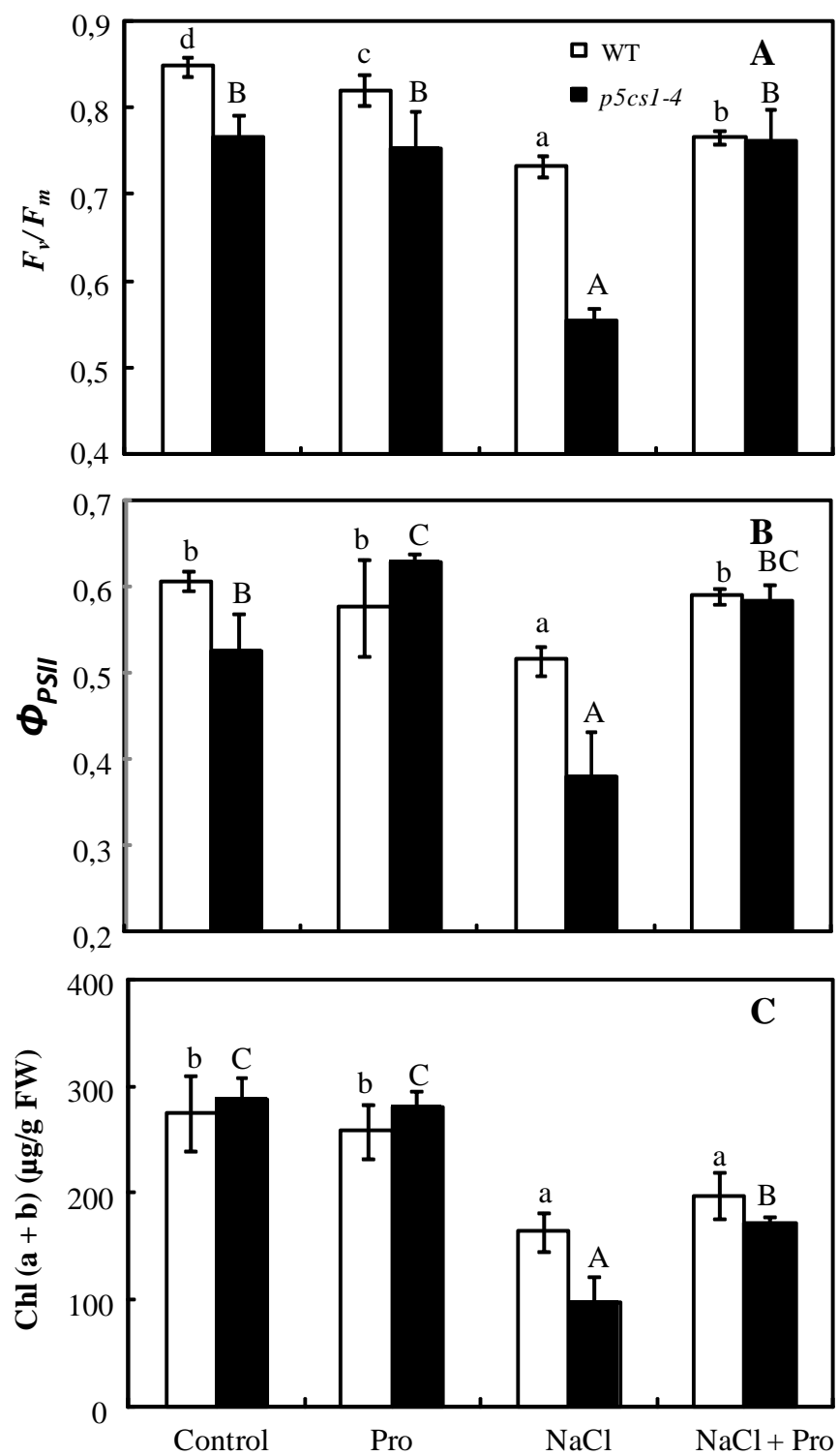


Fig.2.

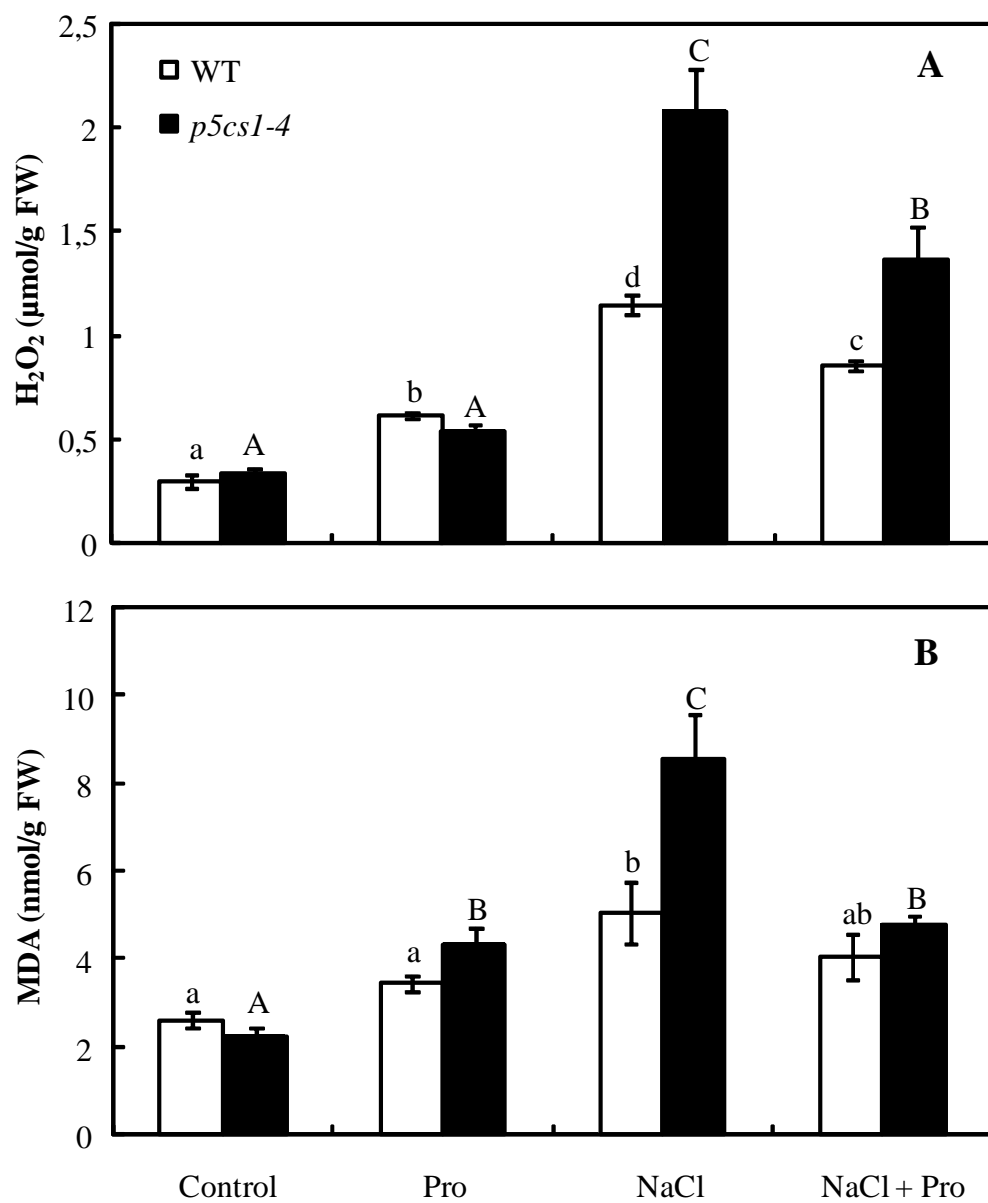


Fig. 3.

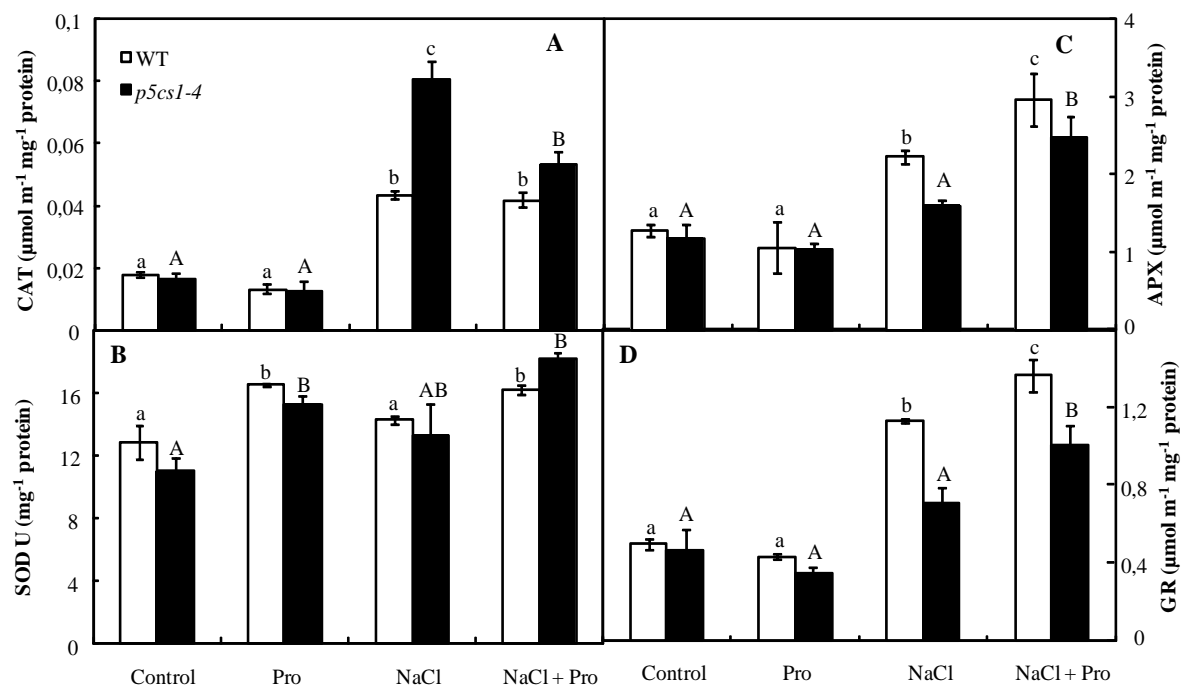


Fig. 4.

Chapitre IV/ Article 4:

**GENESE PRÉCOCE DES ESPÈCES
RÉACTIVES DE L'OXYGÈNE (ERO) ET
CAPACITÉ ANTIOXYDANTE**

CHAPITRE IV

Genèse des Espèces Réactives de l'oxygène (ERO) et implication dans la régulation de la capacité antioxydante

1. Introduction

La salinité des sols constitue l'une des principales contraintes abiotiques limitant la croissance des plantes. Les effets délétères de la salinité sur la croissance des plantes sont généralement associés à ses effets osmotiques, ioniques et nutritionnels. En conséquence à ces effets primaires, des effets secondaires liés à la génération des ERO (comme le radical hydroxyle (OH^\cdot), l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)) surviennent également. Ces ERO provoquent des dommages oxydatifs en s'attaquant aux lipides cellulaires, aux protéines et à l'ADN. Cependant, il est largement admis qu'à faible concentration, les ERO agissent comme des messagers secondaires afin de contrôler une variété de réponses adaptatives. Pour se protéger contre les effets toxiques des ERO, les plantes ont développé des systèmes complexes de détoxification qui permettent de réguler la production des ERO et de les impliquer dans les voies de signalisation. Ces systèmes sont composés des enzymes antioxydantes (comme les catalases (CAT), la superoxyde dismutase (SOD), l'ascorbate peroxydase (APX) et la glutathion réductase (GR)) et de petites molécules, tel que l'ascorbate.

Plusieurs données pharmacologiques et de génétique inverse indiquent que la principale source de production des ERO pendant les interactions biotiques ou à un stade précoce de la réponse aux contraintes abiotiques, est la NADPH oxydase qui est localisée au niveau de la membrane plasmique. Chez *A. thaliana*, il existe 10 gènes qui codent pour différents isoformes de la NADPH oxydase, dénommés *AtrbohA* à *J* (RBOH, respiratory burst oxidase homologues). L'expression des gènes *AtrbohD* et *AtrbohF* est plus fortement induite par la contrainte saline. Leshem et al. (2007) ont montré que la production rapide et transitoire des ERO par les NADPH oxydases participe dans les voies de signalisation associées aux phospholipides conduisant à l'activation des réponses de défense chez *A. thaliana*.

2. objectifs

Les objectifs de ce chapitre consistent à établir la relation entre la production précoce de H₂O₂ par la NADPH oxydase et la défense antioxydante chez *A. thaliana* soumise à la salinité (effet à court et à long terme, 1 et 7 jours respectivement) et d'identifier le statut de H₂O₂, molécule de stress ou de signalisation. La réponse physiologique du double mutant *atrbohdf* affecté au niveau des NADPH oxydases (isoforme D et F) a été étudiée en condition de contrainte saline prolongée.

3. Méthodologies

L'approche a consisté dans une première phase à déterminer l'impact d'un traitement salin à court terme sur l'accumulation de H₂O₂ et les activités des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, APX et GR). L'effet du prétraitement avec un piègeur chimique de H₂O₂ (DMTU), ou des inhibiteurs de la NADPH oxydase (DPI et Imidazole) sur l'activité des enzymes antioxydantes a été aussi déterminé. En outre, la capacité anti-oxydante a été évaluée chez des doubles mutants affectés au niveau des NADPH oxydases (isoformes D et F).

Les graines ont été désinfectées selon la méthode décrite dans le chapitre « Matériel et Méthodes ». Les graines d'*A. thaliana* (Col-0) et du double mutant *atrbohdf* ont été semées sur des petites grilles métalliques d'environ 4,5 cm de diamètre, posées sur un milieu MS/2 (Murashige et Skoog) solidifié avec de l'agar 0,8 % (p/v). Ce milieu est enrichi en saccharose 1 % (p/v) et en vitamines Gamborg B5 1X. La croissance des plantules est effectuée dans une chambre de culture pendant 12 jours, en éclairage continu à 90 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, et à 22° C dans le Laboratoire d'Adaptation des Plantes aux Contraintes Environnementales (APCE à l'UPMC, France). Pour appliquer les traitements salins, les grilles métalliques contenant les plantules ont été transférées vers des boîtes de Pétri de 5 cm contenant 7 mL de milieu MS/2 liquide de même composition décrite précédemment additionné de 200 mM NaCl. Des plantes cultivées en l'absence de contrainte osmotique ont été utilisées comme témoins. Des récoltes ont été effectuées au bout de 1, 6, 12, 18 et 24 h du traitement.

Pour les expériences basées sur l'application de chélateur ou d'inhibiteurs, les plantules sont prétraitées pendant 4 h dans du milieu MS/2 liquide avec l'inhibiteur ou le chélateur. Après la pré-incubation, le stress est appliqué par transfert des filtres vers d'autres

boîtes de Pétri de 5 cm contenant MS/2 avec 200 mM NaCl, en présence ou en l'absence d'inhibiteurs ou de chélateur, pendant 24 h.

Par la suite, le comportement des doubles mutants a été positionné par rapport à celui de l'écotype sauvage sous un traitement salin à long terme. Les graines d'*A. thaliana* d'écotype sauvage (Col-0) et du mutant *atrbohdf* sont semées directement sur un mélange sable:vermiculite (3:1) dans des petits pots puis sont recouverts avec un pot en plastique transparent pendant une semaine et sont placés en serre vitrée (300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ radiation photosynthétique active, température $25\pm 5^\circ \text{C}$, humidité relative $60\pm 10\%$) au Laboratoire des Plantes Exptrémophiles (LPE de Borj Cedria, Tunisie). Les plantules sont arrosées régulièrement avec une solution nutritive Hewitt (1960) diluée 10 fois. Après quatre semaines de prétraitement, les plantules de chaque génotype sont divisées en deux lots, un lot sert de témoin, l'autre est traité par 100 mM NaCl. Un arrosage tous les deux jours avec la solution nutritive de base diluée 4 fois additionnée ou non de NaCl a été opéré. La récolte finale est réalisée au bout de 7 jours. Des paramètres physiologiques et biochimiques ont été déterminés, y compris l'activité de croissance des plantes, le statut hydrique des feuilles, l'activité photosynthétique, la sélectivité Na^+ / K^+ , et la capacité antioxydante.

4. Résultats

L'exposition des plantes sauvages d'*A. thaliana* à 200 mM NaCl pendant 24 h, conduit à une accumulation transitoire de H_2O_2 , qui a été suivie par une augmentation significative des activités des enzymes CAT, APX et GR. En présence de sel, le pré-traitement des plantes par le DMTU, un chélateur de H_2O_2 , ou le DPI et l'imidazole, deux inhibiteurs des NADPH oxydase, conduit à des faibles activités de ces enzymes antioxydantes. De même, on a observé une faible induction de ces enzymes antioxydantes chez le double mutant *atrbohdf* traité par le sel pendant 24 h. Par la suite, nous avons examiné la réponse physiologique de ce mutant lorsqu'il est exposé à 100 mM NaCl, pendant 7 jours. Les résultats ont montré que la meilleure performance des plantes sauvages à faire face à la contrainte saline prolongée, par rapport aux plantes mutantes, est liée au maintien de leur activité photosynthétique, une efficacité sélective d'absorption des ions K^+ , et à la capacité de ces plante à faire face aux effets néfastes du stress oxydatif induit par le sel.

5. Conclusion

Dans l'ensemble, ces données suggèrent que la production précoce de H_2O_2 par les NADPH oxydase en condition de contrainte saline pourrait être le début d'une cascade de réactions qui déclenche la réponse antioxydante chez *A. thaliana*, afin de surmonter la production ultérieure des ERO, ainsi que d'autres mécanismes adaptatifs. Ces données ont fait l'objet d'un manuscrit intitulé "*NADPH oxydase-dependent H_2O_2 production are required for the salt-induced antioxidant defence in Arabidopsis thaliana*"

6. Article 4

Journal of Plant Physiology 174 (2015) 5–15



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Plant Physiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jplph



Physiology

NADPH oxidase-dependent H_2O_2 production is required for salt-induced antioxidant defense in *Arabidopsis thaliana*



Kilani Ben Rejeb^{a,b,*}, Maâli Benzarti^{a,1}, Ahmed Debez^a, Christophe Bailly^c, Arnould Savouré^b, Chedly Abdellly^a

^a Laboratoire des Plantes Extrêmophiles, Centre de Biotechnologie de Borj-Cedria (CBBC), BP 901, Hammam-Lif 2050, Tunisia

^b Adaptation des plantes aux contraintes environnementales, URS, Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Case 156, 4 Place Jussieu, 75252 Paris cedex 05, France

^c UMR 7622, UPMC Univ. Paris 06, CNRS, Bat C 2ème étage, 4, place Jussieu, 75005 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 May 2014

Received in revised form 28 August 2014

Accepted 29 August 2014

Available online 23 October 2014

Keywords:

Salinity

Antioxidant defense system

Atrboh

H_2O_2

Arabidopsis thaliana

ABSTRACT

The involvement of hydrogen peroxide (H_2O_2) generated by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH oxidase) in the antioxidant defense system was assessed in salt-challenged *Arabidopsis thaliana* seedlings. In the wild-type, short-term salt exposure led to a transient and significant increase of H_2O_2 concentration, followed by a marked increase in catalase (CAT, EC 1.11.16), ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) and glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) activities. Pre-treatment with either a chemical trap for H_2O_2 (dimethylthiourea) or two widely used NADPH oxidase inhibitors (imidazole and diphenylene iodonium) significantly decreased the above-mentioned enzyme activities under salinity. Double mutant *atrbohdf* plants failed to induce the antioxidant response under the culture conditions. Under long-term salinity, the wild-type was more salt-tolerant than the mutant based on the plant biomass production. The better performance of the wild-type was related to a significantly higher photosynthetic activity, a more efficient K^+ selective uptake, and to the plants' ability to deal with the salt-induced oxidative stress as compared to *atrbohdf*. Altogether, these data suggest that the early H_2O_2 generation by NADPH oxidase under salt stress could be the beginning of a reaction cascade that triggers the antioxidant response in *A. thaliana* in order to overcome the subsequent reactive oxygen species (ROS) production, thereby mitigating the salt stress-derived injuries.

© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Drought and salt are among the most limiting abiotic stresses to crop productivity and yield. Generally, salinity reduces the plant growth and/or damages the plant through its: (i) osmotic effect (causing water deficit), (ii) ion-related toxic effect, and (iii) impact on the uptake of essential nutrients. As a consequence of these primary effects, secondary stresses such as oxidative damage often occur (Zhu, 2001) due to the excessive accumulation of deleterious chemical compounds called reactive oxygen species (ROS), including hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), and hydroxyl radicals (OH^{\bullet}), which induce cellular damage by protein degradation, enzyme inactivation, alterations in the gene and interference in various pathways of metabolic significance (Choudhury et al., 2013). Still, there is increasing evidence of ROS involvement as signaling molecules in plant responses to abiotic and/or biotic stresses. Indeed, at low concentrations, ROS operate as messengers for the activation of defense genes (Foyer and Noctor, 2009).

Abbreviations: ABA, abscisic acid; APX, ascorbate peroxidase; C, control; CAT, catalase; Chl, chlorophyll; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; DMTU, dimethylthiourea; DPI, diphenylene iodonium; DW, dry weight; F_0 , minimal fluorescence; F_m , maximal fluorescence; F_v/F_m , maximum quantum efficiency of PSII photochemistry; FW, fresh weight; GR, glutathione reductase; H_2DCFDA , 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; H_2O_2 , hydrogen peroxide; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MDA, malonyldialdehyde; NADPH oxidase, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase; NBT, nitroblue tetrazolium; NO, nitric oxide; $O_2^{\bullet-}$, superoxide anion; OH^{\bullet} , hydroxyl radicals; PSII, photosystem II; Rboh, respiratory burst oxidase homologues; ROS, reactive oxygen species; S, salt stress; SOD, superoxide dismutase.

* Corresponding author at: Laboratoire des Plantes Extrêmophiles, Centre de Biotechnologie de Borj-Cedria (CBBC), BP 901, Hammam-Lif 2050, Tunisia. Tel.: +216 79 325 848; fax: +216 79 325 638.

E-mail address: kilani@yahoo.com (K. Ben Rejeb).

¹ These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2014.08.022>

0176-1617/© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Addressing ROS homeostasis is crucial both for mitigating ROS toxicity and to determine their likely role in signaling pathways. Cellular ROS homeostasis depends on a balance between production and degradation of the free radicals. In plants, ROS can be produced by chloroplasts, mitochondria and peroxisomes or by apoplastic cell wall peroxidases, amine oxidases and plasma membrane nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH oxidase) (Gill and Tuteja, 2010). In order to reduce ROS-related damages, plants have evolved a complex antioxidant defense system that scavenges excessively accumulated ROS under stress conditions. This system includes enzymatic (CAT, ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR), and superoxide dismutase, SOD) and non-enzymatic (low molecular weight antioxidant compounds) components (Li et al., 2010).

Pharmacological and genetic data indicate that the enzymes responsible for most of the ROS generated during biotic interactions and in early response to abiotic stresses are the plasma membrane-localized NADPH oxidases, known as respiratory burst oxidase homologues (Rboh) (Wu et al., 2013). The rapid generation of ROS during the early stages of plant defense signaling is known as oxidative burst (Hao et al., 2008). Because H_2O_2 is relatively stable and diffusible through membrane, it is now considered the main ROS that triggers defense mechanisms in plant cells. H_2O_2 has been shown to play many critical roles in signaling and in several aspects of plant development, including in plant defense, root hair development, stomatal closure, and early responses to salt stress (salt stress) (Torres et al., 2002; Foreman et al., 2003; Kwak et al., 2003; Leshem et al., 2007).

The *Arabidopsis* genome contains 10 NADPH oxidase-encoding genes designated as *AtRbohA* to *J* exhibiting different patterns of expression throughout plant development and in response to environmental factors (Fluhr, 2009). Moreover, H_2O_2 produced by NADPH oxidase has been demonstrated to mediate rapid systemic signaling triggered by multiple abiotic stresses (Miller et al., 2009). A transient increase in the endogenous levels of H_2O_2 obtained by exogenous application of salicylic acid or heat can lead to subsequent thermotolerance in mustard seedlings (Dat et al., 1998). In maize, protection against chilling injury can be achieved by a transient increase in endogenous H_2O_2 levels during low-temperature acclimation (Prasad et al., 1994). Alternatively, direct exposure of plant tissues to H_2O_2 has been shown to activate antioxidant enzymes as well as the expression of antioxidant enzyme-encoding genes (Mylona and Polidoros, 2010). Both *AtRbohD* and *AtRbohF* have been identified as main isoforms, which are highly expressed under salt stress (Ma et al., 2012; Xie et al., 2011). Leshem et al. (2007) have described that H_2O_2 produced by NADPH oxidase are coordinated by phospholipid-regulated signaling pathways and act in the signal transduction of salt stress responses in *Arabidopsis*, and to be required for haem oxygenase mediated salt acclimation signaling in *Arabidopsis* (Xie et al., 2011).

The present study aims at better understanding the relationship between the early production of H_2O_2 by the NADPH oxidase and the antioxidant response of *Arabidopsis thaliana* seedlings exposed to short and long salt treatments. The function and the implication of H_2O_2 as a stressor or as a signaling molecule were also studied. First, the effect of short-term salinity on the H_2O_2 production and the antioxidant enzyme activities (SOD, CAT, APX and GR) was investigated. Then, the effect of pre-treatment with dimethylthiourea (DMTU), a chemical trap for H_2O_2 and diphenylene iodonium (DPI) and imidazol, an NADPH oxidase inhibitor on the activities of the salt stress-induced antioxidant enzymes were examined. Moreover, the antioxidant response was assessed in *atrbohdf* double mutant. Finally, the comparative responses of *atrbohdf* plants and the wild-type to long-term salt-stress were addressed. Several parameters were considered including the plant growth activity,

the photosynthetic activity, leaf Na^+/K^+ selectivity, and the oxidative stress leaf responses.

Materials and methods

Plant material and culture conditions

Arabidopsis thaliana transposon insertion mutant lines *atrbohdf-3* (European Arabidopsis Stock Centre code N9555), *atrbohdf-3* (European Arabidopsis Stock Centre code N9557) and double mutant *atrbohdf* (European Arabidopsis Stock Centre code N9558) (Torres et al., 2002) were ordered from the European Arabidopsis Stock Centre.

In a first experiment, the implication of hydrogen peroxide (H_2O_2) in the induction of antioxidant response to short-term salt stress was assessed. Surface-sterilized seeds of wild-type (ecotype Columbia (Col-0)) and *Arabidopsis* mutant plants were sown in square Petri dishes on half-strength agar-solidified Murashige and Skoog (MS) medium according to Parre et al. (2007). After 24 h at 4 °C to break dormancy, seedlings were grown at 22 °C under continuous light (90 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Twelve day-old *Arabidopsis* seedlings were transferred to liquid MS/2 medium supplemented or not with 200 mM NaCl and harvested at 3, 6, 9 and 24 h. In order to study the effects of scavengers and inhibitors, the seedlings were pre-incubated or not for 4 h with either 40 mM dimethylthiourea (DMTU, a chemical trap for H_2O_2) or 20 μM diphenylene iodonium (DPI) or 10 mM imidazol, two nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH oxidase) inhibitors. They were then grown in liquid MS/2 medium at 200 mM NaCl for 24 h under the same conditions as described above. All experiments were performed with three independent biological and three technical repetitions.

In a second experiment, seeds of the wild-type (Col-0) and the mutant *atrbohdf* were sown in pots containing a mixture of vermiculite:sand (1:3). Seedlings were irrigated with one-quarter-strength (Hewitt, 1960) nutrient solution under greenhouse conditions (300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetic active radiation (PAR), 25 ± 5 °C temperature, and $60 \pm 10\%$ relative humidity). Four week-old plants at rosette stage were exposed to 100 mM NaCl for 7 d. To reduce osmotic shock on plants, salt treatments were daily increased by 50 mM NaCl. Pots were irrigated every 2 d.

Chlorophyll fluorescence measurements, plant growth, leaf chlorophyll and ion concentrations

Chlorophyll (Chl) fluorescence was measured using a modulated chlorophyll fluorimeter (OS1-FL) following the procedure described by Genty et al. (1989). The minimal (F_0) and maximal (F_m) Chl a fluorescence were assessed in leaves after 20 min of dark adaptation. The maximum quantum efficiency of Photosystem II (PSII) photochemistry was calculated as $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$.

At the harvest, rosette fresh weight (FW) was immediately estimated and dry weight (DW) was determined after having being dried at 60 °C until constant weight. Chl was extracted from 100 mg leaf FW in 5 ml 100% acetone. After centrifugation for 5 min at 500 \times g, supernatants were measured at 470, 645, and 662 nm. Concentrations of total Chl were calculated as given by Lichtenthaler (1987). After ion extraction from dried ground leaf in 0.5% HNO_3 , Na^+ and K^+ was assayed by flame emission photometry (Corning, UK).

H_2O_2 concentration

H_2O_2 concentration was determined spectrophotometrically as described by Oracz et al. (2009). 300 mg FW plant materials were ground in a mortar on ice in 1 ml perchloric acid

(0.2 M). After 15 min of centrifugation at $13,000 \times g$ at 4°C , the resulting supernatant was neutralized to pH 7.5 with 4 M KOH and then centrifuged at $13,000 \times g$ at 4°C . The supernatant was immediately used for spectrophotometric determination of H_2O_2 using a horseradish peroxidase-based assay with 3-dimethylaminobenzoic acid and 3-methyl-2-benzothiazolidone hydrazone. The increase in absorbance at 590 nm was monitored for 15 min after the addition of peroxidase at 25°C and analyzed using a calibration curve obtained with known amounts of fresh H_2O_2 .

Histochemical detection of H_2O_2

Arabidopsis roots were collected after 6 h treatment with NaCl and immersed with $25 \mu\text{M}$ 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H_2DCFDA) for 15 min in the dark and then washed with 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6). Fluorescent signals were visualized using a Zeiss ApoTome microscope (excitation, 488 nm; emission, 525 nm). 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) staining was performed according to Torres et al. (2002). Detached leaves were vacuum-infiltrated with a DAB solution (10 mg ml^{-1} DAB-HCl, pH 3.8). DAB generates a radish-brown DAB polymer that can be detected at the site of H_2O_2 formation. After staining, leaves were cleared in 96% boiling ethanol and observed with a loupe. For both staining methods, digital images were obtained via AxioCam camera and AxioVision software (Zeiss).

Measurement of lipid peroxidation

Lipid peroxidation was estimated by measuring the concentration of malonyldialdehyde (MDA). Fresh leaf samples (0.1 g) were homogenized in 0.1% (w/v) TCA solution. The homogenate was centrifuged at $15,000 \times g$ for 10 min. An aliquot of the supernatant was added to 0.5% TBA in 20% TCA. The mixture was heated at 90°C for 30 min in a shaking water bath, and then cooled in an ice bath. The samples were centrifuged at $10,000 \times g$ for 5 min, and the absorbance of the supernatant was read at 532 and 600 nm (Ben Amor et al., 2005). The MDA concentration was calculated according to the molar extinction coefficient of MDA ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Enzyme extraction and assays

For catalase (CAT) (EC 1.11.16), glutathione reductase (GR) (EC 1.6.4.2) and superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.11) activity, frozen leaf sample (0.3 g) was homogenized in 5 ml of a potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.8) containing 2 mM dithiothreitol, 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1.25 mM polyethylene glycol 4000 and 10% (w/v) of polyvinylpyrrolidone (PVP). For ascorbate peroxidase (APX) (EC 1.11.1.11) activity, leaf material was homogenized in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 1 mM ascorbate (Asc), 0.1 mM EDTA, and 1% (w/v) PVP. The homogenate was then centrifuged for 30 min at $14,000 \times g$ and the supernatant was desalted on a PD 10 column (GE Healthcare). All steps of the extraction procedure were carried out at 4°C . Protein contents of the extracts were determined using the Bio-Rad protein assay kit with bovine serum albumin as calibration standard. The total activities of antioxidant enzymes were determined according to Bailly et al. (1996). Total SOD activity was assayed by monitoring the inhibition of photochemical reduction of nitroblue tetrazolium (NBT). One unit of SOD activity was defined as the amount of enzyme that was required to cause 50% inhibition of the reduction of NBT as monitored at 560 nm. Total CAT activity was assayed by measuring the H_2O_2 decomposition rate at 240 nm. GR activity was determined at 25°C as described previously by Esterbauer and Grill (1978), by following the NADPH oxidation

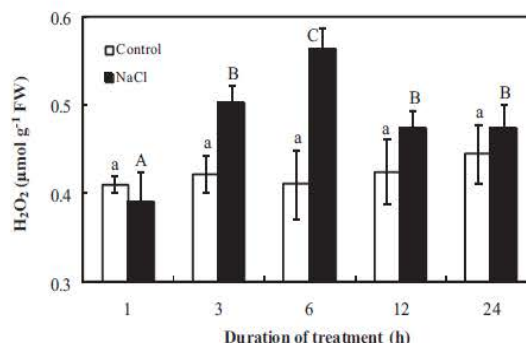


Fig. 1. Time-course changes in H_2O_2 accumulation of wild-type *Arabidopsis thaliana* seedlings exposed or not to 200 mM NaCl for 24 h. Means ($\pm \text{SE}$) of three independent experiments with different letters are significantly different at $P < 0.05$. Each experiment contained three independent biological repetitions.

rate at 340 nm. Total APX activity was measured by monitoring the decrease in absorbance at 290 nm as ascorbate was oxidized.

RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from 100 mg of homogenized tissue using the RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Traces of DNA were removed by DNase treatment. RNA quantification was done at 260 nm using a Nanovue® spectrophotometer (GE Healthcare Life Science). First-strand cDNA was performed from $1.5 \mu\text{g}$ of total RNA using RevertAidTM reverse transcriptase synthesis kit (Fermentas). For RT-PCR, cDNAs were amplified using Taq polymerase and gene-specific primers. The *APT1* (adenine phosphoribosyltransferase 1; At1g27450) gene was used as a control. Amplified PCR fragments were visualized using ethidium bromide stained 2% (w/v) agarose gels. The gene-specific primers are as follows: *APT1* forward (5'-GAGACATTTT-GCGTGGGATT-3') and reverse (5'-CGGGGATTTTAAGTGAACA-3') *AtrbohD* forward (5'-CTGGACACGTAAGCTCAGGA-3') and reverse (5'-GCCGAGACCTACGAGGAGTA-3') and *AtrbohF* forward (5'-TCACAATCAACGACGAGATT-3') and reverse (5'-CCCATCTTCATTCT-TGTCCA-3').

Results

Role of endogenous H_2O_2 in the antioxidant activity induction under short-term salt stress

H_2O_2 concentration in wild-type *A. thaliana* seedlings exposed for 1 h–200 mM NaCl salinity was similar to that of the control (Fig. 1). However, salt exposure for 3 h resulted in a marked accumulation of H_2O_2 , reaching a maximum at 6 h before progressively decreasing (especially at 24 h), whereas no significant changes occurred for the control (Fig. 1). The H_2O_2 peak accumulation observed at 6 h was associated with significantly higher SOD activity, the latter however sharply declining thereafter (Fig. 2A). In the 12–24 h time range, salt stressed plants showed close values to that of the control. Concomitant with the marked decrease of H_2O_2 concentration upon salt exposure for 12–24 h, CAT, APX, and GR (Fig. 2C and D) activities increased significantly in this time range (between 3- and 5-fold higher than values registered at 1 h of salt treatment). It is noteworthy that the enzyme activities registered in the control remained unchanged during the experiment.

To assess whether endogenous H_2O_2 is involved in NaCl-induced antioxidant enzyme activities, wild-type *A. thaliana* seedlings were pre-treated or not for 4 h with 40 mM DMU, a chemical trap for H_2O_2 , and then exposed to 200 mM NaCl

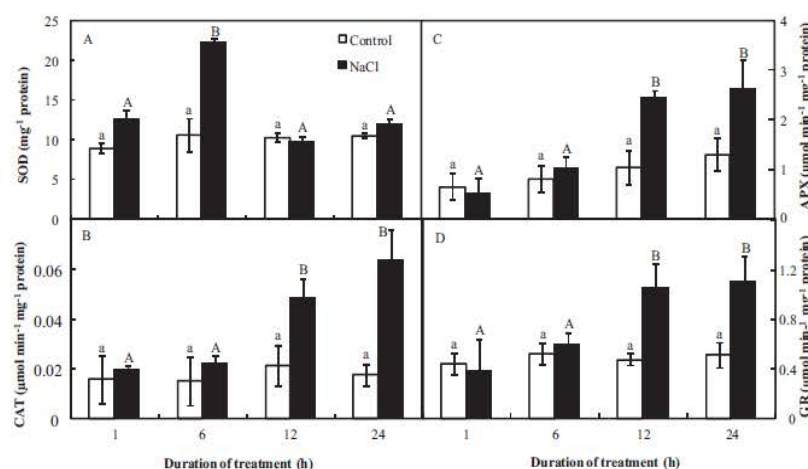


Fig. 2. Time-course changes in the activities of antioxidant enzymes SOD (A), CAT (B), APX (C), and GR (D) of wild-type *Arabidopsis thaliana* seedlings exposed or not to 200 mM NaCl for 24 h. Means (\pm SE) of three independent experiments with different letters are significantly different at $P < 0.05$. Each experiment contained three independent biological repetitions.

treatment. No significant impact on the antioxidant enzyme activities in the control was observed, whereas salt-challenged plants previously treated with DMTU showed significantly lower SOD, CAT, APX, and GR activities as compared to plants directly exposed to salinity (−14%, −37%, −34% and −49%, respectively) (Fig. 3A–D).

NADPH oxidase-dependent H_2O_2 production is required for NaCl induced antioxidant enzymes

To investigate the role of *Atrboh*d and *Atrboh*f in the early production of H_2O_2 , the expression patterns of *Atrboh*d and *Atrboh*f in wild-type *A. thaliana* under salt stress and control conditions were explored using RT-PCR methods. As shown in Fig. 4, treatment with NaCl clearly increased the expression of *Atrboh*d and *Atrboh*f at 6 h. To ascertain the likely role of H_2O_2 originating from NADPH oxidase in NaCl-induced SOD, CAT, APX and GR activities in *Arabidopsis*, the effect of pre-treatment with DPI or imidazole, two widely used NADPH oxidase inhibitors, on NaCl-induced H_2O_2

generation and antioxidant enzyme activities was first investigated. Incubation in 20 μ M DPI or 10 mM imidazole completely prevented the production of H_2O_2 in leaves and root tips of wild-type *A. thaliana* seedlings (Fig. 5) and fully blocked the enhancement of SOD, CAT, APX and GR activities previously observed under salt stress (Fig. 3). To further confirm these pharmacological data, we used *Arabidopsis* single and double mutants of *atrboh*d and *atrboh*f, two highly expressed *Atrboh* genes under salt stress (Xie et al., 2011; Ma et al., 2012). NaCl-induced H_2O_2 generation (Fig. 6) was partially inhibited in *atrboh*f but more severely impaired in *atrboh*d and the double mutant *atrboh*d/f as compared to salt-treated wild-type. Since *atrboh*f acts redundantly with *atrboh*d in regulating salt responses (Ma et al., 2012), we used only the *atrboh*d/f double mutants in our further investigations. As observed for the wild-type pre-treated with DPI, NaCl-induced CAT, APX and GR activities were strongly impaired in the double mutant *atrboh*d/f as compared to the salt-treated wild-type plants (Fig. 7). To further address the role of H_2O_2 , we tried to reverse the effect of *atrboh*d/f mutation by the exogenous

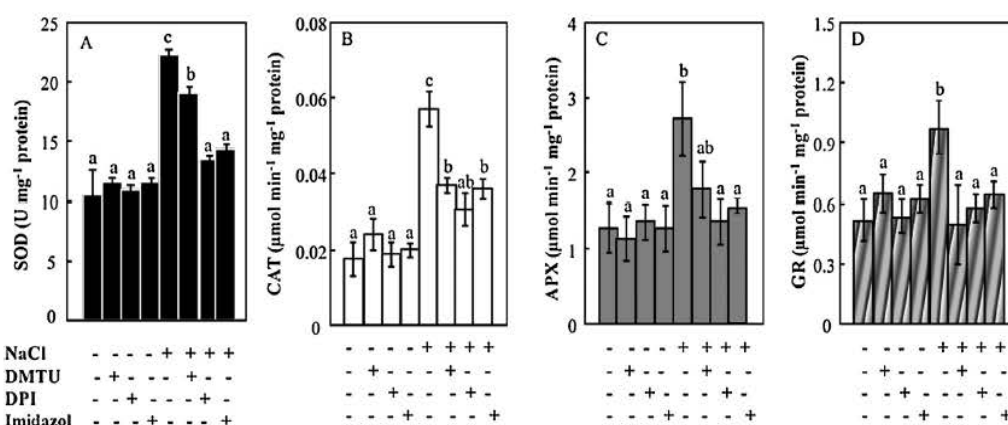


Fig. 3. Effect of pre-treatment with DMTU, DPI or Imidazole on SOD (A), CAT (B), APX (C) and GR (D) activities of wild-type *Arabidopsis thaliana* seedlings exposed or not to 200 mM NaCl. Plants were pre-incubated with 40 mM DMTU or 20 μ M DPI or 10 mM Imidazole for 4 h and then exposed or not to NaCl. (A) Plants exposed to NaCl for 6 h. (B)–(D) Plants exposed to NaCl for 24 h. Means (\pm SE) of three independent experiments with different letters are significantly different at $P < 0.05$. Each experiment contained three independent biological repetitions.

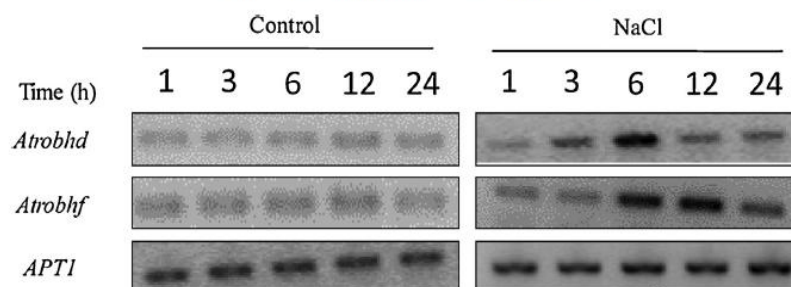


Fig. 4. Expression patterns of the *Atrobhd* and *Atrobhf* genes. RT-PCR were performed with RNAs extracted at the indicated times from wild-type *Arabidopsis thaliana* leaves treated without or with 200 mM NaCl. The constitutive *APT1* gene is used as a control. Representative data of three independent RNA extractions are shown.

application of 10 mM H_2O_2 . This pre-treatment restored significantly CAT, APX and GR activities in NaCl-treated *atrobhd/f* seedlings whereas no impact was observed for the salt-treated wild-type (Fig. 7).

Responses of wild-type *A. thaliana* and *atrobhd/f* mutant plants to long-term moderate salt stress

Short-term (2 d) salinity had no significant effect on the rosette fresh weight (FW) of both genotypes, whereas long-term (7 d) salt-exposure restricted significantly the plant growth, especially in the *atrobhd/f* mutant as compared to the wild-type (–30% and –17% of the respective control values at 7 d) (Table 1). Rosette Na^+ concentration increased significantly with salt exposure in concomitance with a marked decrease in K^+ concentration (Table 1). This trend was more pronounced in the salt-sensitive genotype (*atrobhd/f*), resulting in significantly higher Na^+/K^+ values in the latter genotype as compared to the wild-type (Table 1). Chlorophyll (Chl) concentrations were also lower in salt-treated plants of both genotypes, especially in the *atrobhd/f* mutant, which showed 50% lower Chl concentration than the wild-type after 7 d of salt treatment (Table 1). The wild-type showed a decline of the maximal photochemical efficiency of PSII (F_v/F_m) after 2 d of exposure to NaCl stress, whereas the salt-related decrease of photosystem II (PSII) appeared later (after 7 d salt exposure) and was more pronounced in the *atrobhd/f* mutant (Table 1). After 2 d of salt treatment, *atrobhd/f* showed significantly lower H_2O_2 concentration than the wild-type (Table 2). Long-term (7 d) salt exposure clearly increased

the levels of H_2O_2 in both genotypes, though a higher extent in the mutant *atrobhd/f*. In addition, malonyldialdehyde (MDA) concentration, as an indicator of lipid peroxidation, increased in the wild-type plants after 2 d of NaCl exposure, whereas remaining unchanged in the *atrobhd/f* mutant. In contrast, after exposure to 100 mM NaCl for 7 d, oxidative damage was more marked in the mutant compared to the wild-type as reflected by the higher MDA concentration in the former genotype (Table 2). Regarding the antioxidant response, wild-type plants exposed for 2 d with 100 mM NaCl showed significantly higher CAT, APX and GR activities (up to 3.3-fold increase for CAT). The same trend was observed under long-term salinity conditions, although it was less pronounced (Table 2). In the case of *atrobhd/f* mutant, no significant change in the abovementioned enzyme activities was observed irrespective of the salt treatment duration (Table 2).

Discussion

Salinity, as many environmental stresses, is known to generate ROS which are toxic but may act as a signaling molecule when accumulated at low/moderate concentrations (Mittler et al., 2004). To maintain a relatively low ROS concentration, plants have evolved highly regulated enzymatic and non-enzymatic mechanisms to keep a balance between ROS production and detoxification so that the cellular redox homeostasis can be maintained (Ahmad et al., 2010). In the present study, short-term salt stress (24 h) induced a transient increase of H_2O_2 concentration up to 6 h treatment (Fig. 1). It is well established that the H_2O_2 accumulation is an early

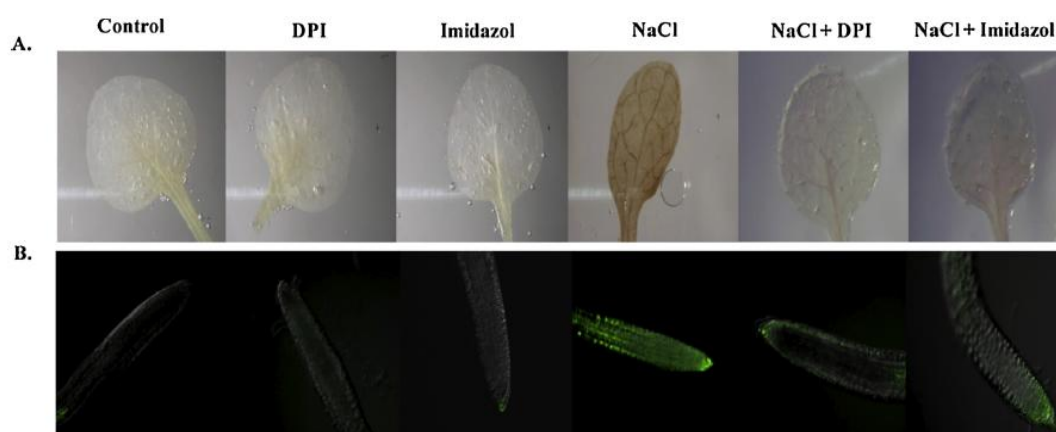


Fig. 5. H_2O_2 production visualized by using DAB or 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H_2DCFDA) staining in wild-type *Arabidopsis thaliana* leaves (A) and roots tips (B) pre-treated with 20 μ M DPI or 10 mM Imidazol and grown under normal conditions or in the presence of 200 mM NaCl for 6 h.

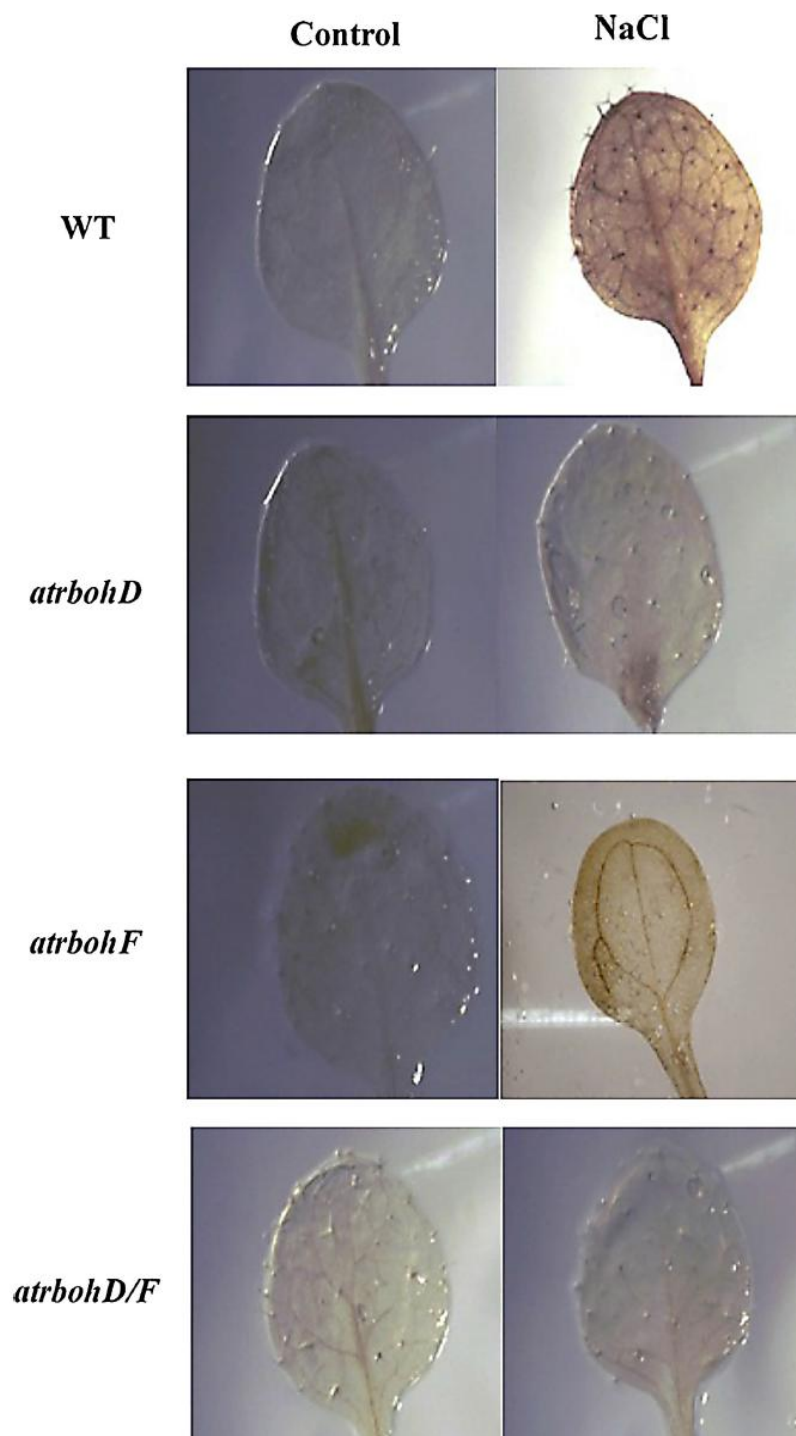


Fig. 6. H_2O_2 production, estimated by DAB staining, in leaves of *Arabidopsis thaliana* wild-type, *atrbohD*, and *atrbohF* single mutant and *atrbohD/F* double mutant exposed to 200 mM NaCl for 6 h.

Table 1

Effect of salt stress (100 mM NaCl) on growth (rosette fresh weigh, g plant⁻¹), Na⁺, K⁺ concentrations (mmol g⁻¹ DW), total Chlorophyll content (μg g⁻¹ FW) and on the chlorophyll fluorescence (F_v/F_m) of leaves of *Arabidopsis thaliana* wild type and *atrbohdf* double mutant. Mean (n = 6 ± SE) with different letters were significantly different at P < 0.05. C, control; S, salt stress.

			FW	Na ⁺	K ⁺	Na/K	Chl	F _v /F _m
WT	2d	C	0.70 ± 0.02 ^b	0.27 ± 0.05 ^a	1.08 ± 0.04 ^b	0.25 ± 0.06 ^a	341 ± 42 ^c	0.81 ± 0.02 ^b
		S	0.70 ± 0.01 ^b	1.43 ± 0.04 ^b	0.85 ± 0.03 ^a	1.69 ± 0.12 ^b	268 ± 3 ^b	0.63 ± 0.03 ^a
	7d	C	0.71 ± 0.02 ^b	0.20 ± 0.02 ^a	0.98 ± 0.11 ^b	0.22 ± 0.01 ^a	323 ± 24 ^c	0.81 ± 0.01 ^b
		S	0.60 ± 0.03 ^a	1.67 ± 0.04 ^b	0.85 ± 0.08 ^a	1.95 ± 0.21 ^c	167 ± 23 ^a	0.67 ± 0.02 ^a
<i>atrbohdf</i>	2d	C	0.72 ± 0.02 ^B	0.24 ± 0.02 ^A	0.9 ± 0.02 ^B	0.27 ± 0.03 ^A	310 ± 12 ^B	0.8 ± 0.03 ^B
		S	0.71 ± 0.03 ^B	1.88 ± 0.12 ^B	0.67 ± 0.02 ^A	2.77 ± 0.24 ^B	297 ± 29 ^B	0.76 ± 0.02 ^B
	7d	C	0.71 ± 0.01 ^B	0.22 ± 0.01 ^A	1.17 ± 0.14 ^B	0.27 ± 0.01 ^A	291 ± 33 ^B	0.84 ± 0.01 ^B
		S	0.50 ± 0.01 ^A	1.98 ± 0.04 ^B	0.67 ± 0.08 ^A	3.01 ± 0.33 ^C	86 ± 15 ^A	0.58 ± 0.01 ^A

common response to various environmental stresses factors, such as pathogen attack (Torres et al., 2002), heat stress (Saidi et al., 2011), drought and salt stress (Miller et al., 2011). There are many potential sources of H₂O₂ in plant cells, including chloroplasts, mitochondria, peroxisomes, plasma membrane NADPH oxidase, cell wall peroxidases, apoplastic oxalate, and amine oxidase (Gill and Tuteja, 2010). In *Arabidopsis*, it has been documented that the plasma membrane-located NADPH oxidase is mainly involved in H₂O₂ production in early response to salt stress (Leshem et al., 2007). Our result showed that exposure of wild-type *A. thaliana* to NaCl increased the expression of *Atrboh* and *Atrboh* at 6 h, in agreement with the previous results reported by Xie et al. (2011). These findings imply that NaCl can rapidly activate *Atrboh* and *Atrboh* to produce ROS, which trigger some mechanisms to alleviate the phytotoxic effects of salt stress (Ma et al., 2012). NADPH oxidase transfers electrons from NADPH to O₂ to form O₂^{•-}, followed by dismutation of O₂^{•-} to H₂O₂ by SOD. The likely role of H₂O₂ originating from this enzyme in ROS signaling has recently received attention. Interestingly, our findings indicate that in the wild-type *A. thaliana*, salt treatment induced H₂O₂ accumulation in concomitance with higher SOD activity (Fig. 2A), leading to think that the increase in SOD activity may be partially due to the increased NADPH oxidase activity. In salt-stressed barley, a transient increase in SOD activity was also observed, strongly suggesting that O₂^{•-} radical dismutation into H₂O₂ during the initial phases of salt exposure is of high significance with respect to stress signaling and adaptation (Maksimovic et al., 2013). In *A. thaliana* mutants deficient in NADPH oxidase, a significant reduction of SOD activity, mainly Cu/Zn SOD, was recorded in response to arsenic (As), contrasting with wild-type plants (Gupta et al., 2013). In the same way, we show that when *A. thaliana* seedlings were pre-treated either with 20 μM DPI or 10 mM imidazol, two widely used NADPH oxidase inhibitors, the NaCl-related transient increase of both SOD activity and H₂O₂ accumulation at 6 h was suppressed, which suggests that the salt-induced H₂O₂ production originated at least partially from the plasma-membrane NADPH oxidase.

The decrease of H₂O₂ concentration in salt-treated plants was associated with an increase of CAT, APX and GR activities (Fig. 2),

likely as a consequence of the direct effect of NaCl or the indirect effect mediated via an increase in levels of H₂O₂. Therefore, we hypothesized that in the wild-type *A. thaliana* seedlings the early H₂O₂ accumulation during salt stress might serve as second messenger to induce CAT, APX and GR activities. This hypothesis was supported by the fact that plant pre-treatment with 40 mM DMTU, a chemical trap for H₂O₂, led to significantly lower CAT, APX and GR activities under salinity as compared to non-pre-treated plants growing in the same conditions (Fig. 3). The rapid increase of APX and GR activities following salt exposure of *A. thaliana* seedlings is consistent with previous reports indicating that the activity and transcript levels of these proteins were increased within 8 h in salt-treated rice roots (Tsai et al., 2005; Nam et al., 2012). When the response of major antioxidant enzymes transcripts was analyzed for different developmental stages in salt stresses rice, increased CAT, APX and GR transcripts accumulation was observed at 12 h exposure, and the transcript levels remained higher than control samples throughout the experimental period (72 h) (Menezes-Benavente et al., 2004). Lin and Pu (2010) studied changes in enzymes involved in ROS scavenging in sweet potato plants tolerant and sensitive to salinity. After exposure to salinity, APX activity increased in plants at 24 h and 48 h, and this response was higher in a salt-tolerant genotype than in the salt sensitive ones. The expression of APX in response to salinity was tissue specific and dependent on stress duration (Caverzan et al., 2012). Morita et al. (1999) reported that the cytosolic APX is regulated by the H₂O₂ level within rice cells. In *Arabidopsis*, a total of five genes coding for APX isoforms in the chloroplast (*APX4* and *APX5*), cytosol (*APX1* and *APX2*) and microbodies (*APX3*) (Santos et al., 1996) have been identified. APX found in organelles scavenges H₂O₂ produced within the organelles, whereas cytosolic APX eliminates H₂O₂ produced in the cytosol, or that diffused from apoplast or organelles (Mittler and Zilinskas, 1992). H₂O₂-treated *Arabidopsis* leaves also showed increased tolerance to excess light which was associated with induced *APX1* and *APX2* expression (Karpinski et al., 1999). Furthermore, the systemic induction of *APX1* and *APX2* was shown to be mediated by the endogenous H₂O₂. According to Rizhsky et al. (2004), Zat12 (zinc finger protein) is an important component

Table 2

Effect of salt stress (100 mM NaCl) on H₂O₂ (μmol g⁻¹ FW), malonyldialdehyde (MDA, nmol g⁻¹ FW) CAT, APX, GR (μmol min⁻¹ mg⁻¹ protein) and SOD (U mg⁻¹ protein) enzyme activities in rosettes of *Arabidopsis thaliana* wild type and *atrbohdf* double mutant. Mean (n = 6 ± SE) with different letters were significantly different at P < 0.05. C, control; S, salt stress.

			H ₂ O ₂	MDA	CAT	APX	GR	SOD
WT	2d	C	0.29 ± 0.01 ^a	2.2 ± 0.04 ^a	0.021 ± 0.002 ^a	1.31 ± 0.1 ^a	0.61 ± 0.02 ^a	10 ± 2.2 ^a
		S	0.72 ± 0.05 ^b	2.9 ± 0.2 ^b	0.069 ± 0.01 ^c	3.10 ± 0.3 ^c	1.8 ± 0.01 ^c	12 ± 2.1 ^a
	7d	C	0.32 ± 0.03 ^a	2.3 ± 0.4 ^a	0.024 ± 0.005 ^a	1.47 ± 0.2 ^a	0.78 ± 0.15 ^a	11 ± 1.3 ^a
		S	1.2 ± 0.01 ^c	5.7 ± 0.2 ^c	0.043 ± 0.007 ^b	2.67 ± 0.2 ^b	1.05 ± 0.06 ^b	15 ± 1.7 ^b
<i>atrbohdf</i>	2d	C	0.27 ± 0.00 ^A	2.29 ± 0.8 ^A	0.018 ± 0.002 ^A	1.19 ± 0.2 ^A	0.59 ± 0.02 ^A	9 ± 2.6 ^A
		S	0.3 ± 0.04 ^A	2.03 ± 0.2 ^A	0.021 ± 0.006 ^A	1.49 ± 0.1 ^A	0.57 ± 0.00 ^A	11 ± 2.2 ^A
	7d	C	0.26 ± 0.01 ^A	2.12 ± 0.1 ^A	0.019 ± 0.001 ^A	1.15 ± 0.02 ^A	0.62 ± 0.19 ^A	11 ± 1.8 ^A
		S	1.8 ± 0.09 ^B	7.05 ± 0.4 ^B	0.024 ± 0.003 ^A	1.88 ± 0.05 ^A	0.78 ± 0.27 ^A	14 ± 1.1 ^B

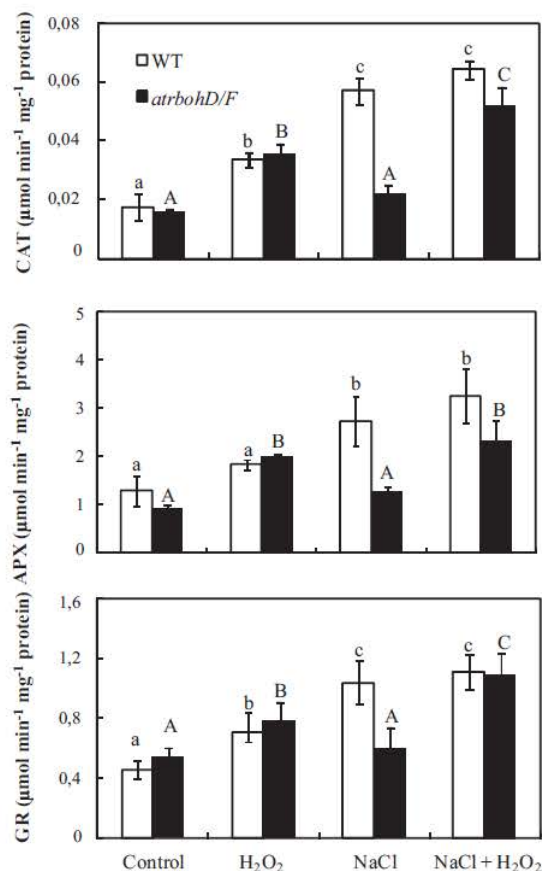


Fig. 7. Effect of NaCl stress (200 mM NaCl) on the activities of CAT, APX and GR in wild-type *Arabidopsis thaliana* seedlings and *atrbohD/F* double mutant. Seedlings were pre-treated with 10 mM H₂O₂ for 4 h and then exposed to 200 mM NaCl for 24 h. Means (\pm SE) of three independent experiments with different letters are significantly different at $P < 0.05$. Each experiment contained three independent biological repetitions.

of the H₂O₂ signal transduction network of *Arabidopsis* required for APX1 expression during oxidative stress. It was reported that a cAPX (*Apx1*)-lacking *Arabidopsis* mutant showed elevated H₂O₂ levels and the induction of several defense genes, indicating the importance of cAPX in controlling cellular H₂O₂ signaling (Pnueli et al., 2003). It seems likely that the induction in cAPX expression during an early stage of oxidative stress plays an important role in removing H₂O₂ and minimizing photooxidative damage. The transient accumulation of H₂O₂ following cAPX expression has been also observed in methyl viologen and high-light exposed Spinach (Yoshimura et al., 2000). In the latter study the change in the expression of cAPX paralleled the increase of the corresponding protein activity.

CAT is also a predominant enzyme controlling H₂O₂ level in plants (Xing et al., 2007). In *Arabidopsis*, three encoding genes (*CAT1*, *CAT2* and *CAT3*) have been identified (Frugoli et al., 1996). Salt stress-induced *CAT1* expression has been shown to be triggered by an ABA-dependent mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase *AtMEK1* and to depend on H₂O₂ production (Xing et al., 2007). Ye et al. (2011) have shown that endogenous abscisic acid (ABA) regulates both H₂O₂ production and *CAT* gene expression

in rice leaves under water stress, which in turn keep H₂O₂ as a signaling molecule rather than a cytotoxic chemical. Several studies also showed that ABA can induce the expression of antioxidant genes and enhance the capacity of antioxidant defense system. In the ABA signal transduction, several signal molecules such as calcium ion (Ca²⁺), ROS and proteins kinases such as MAPK and Ca²⁺-dependent protein kinase (CDPK) have been shown to play important roles in the regulation of antioxidant defense systems. Genetic evidence shows that there exists a complex relationship between ABA, CDPK and MAPK in plants response to environmental stress. *AtMPK6* in *Arabidopsis* and its homologues in rice and maize, *OsMPK1* and *ZmMPK5*, have been shown to be involved in ABA-induced antioxidant defense (Xing et al., 2007; Lin et al., 2009; Zhang et al., 2012). In rice, a recent study showed that *OsCPK12* can induce the expression of the antioxidant genes *OsAPX2* and *OsAPX8* under salt stress, and reduce the salt-induced accumulation of H₂O₂ (Asano et al., 2012). However, the detoxification of ROS regulation by *OsCPK12* under salt stress seems to be ABA independent (Asano et al., 2012). Zhang et al. (2006) reported that pretreatment of maize plants with the ROS inhibitors or scavengers, such as DPI, imidazole, Tiron, and DMTU, significantly reduced the activation of the ABA-induced MAPK. Meanwhile, ABA treatment induced the increases in the transcript levels of antioxidant genes such as *CAT1*, *cAPX*, and *GR1* and the increase in the total activities of the antioxidant enzymes CAT, APX, GR, and SOD in leaves of maize plants were substantially blocked by pretreatment with the MAPK inhibitors and the ROS inhibitors or scavengers. More recently, Ding et al. (2013) showed that *ZmCPK11* is required for ABA-induced up-regulation of the expression and the activity of cAPX in maize leaves under water stress and functions upstream of *ZmMPK5* in ABA-signaling. However, in *Arabidopsis*, a recent study demonstrated that, in response to salt stress, CDPK and MAPKs act in parallel and no direct cross-talk exists between them (Mehlmer et al., 2010).

Our findings indicated that DPI pre-treatment completely suppressed the enhancement in the activities of CAT, APX and GR observed under salt stress in the wild-type *A. thaliana* (Fig. 3). Furthermore, neither H₂O₂ accumulation (Fig. 6) nor stimulated antioxidant enzyme activities were observed in the salt-challenged KO-*atrbohD/f* double mutant (Fig. 7). In the same way, a significant induction of cAPX transcript was observed 6 h after mild salt stress exposure of wild-type *A. thaliana* seedlings, whereas only a slight increase in cAPX transcript level was observed in *atrbohD* mutants (Xie et al., 2011). Pre-treating maize leaves with DPI or DMTU also fully prevented the enhancement in the activities of chloroplastic and cytosolic SOD, APX and GR induced by ABA treatment (Hu et al., 2006). Jiang and Zhang (2002a,b) have demonstrated the involvement of ROS originated from NADPH oxidase in ABA-induced antioxidant defense system in maize leaves exposed to water deficit stress. Kwak et al. (2003) reported that disruptions in *AtrbohD* and *AtrbohF*, impair ABA-induced Ca²⁺ signaling through preventing apoplastic Ca²⁺ to enter the guard cells. Elevated cytosolic Ca²⁺ levels have been shown to play important roles in ROS signaling and salt tolerance in plants (Kader and Lindberg, 2010). In a recent study, Ma et al. (2012) reported that NaCl significantly elevated the Ca²⁺ influx currents and [Ca²⁺]_{cyt} in a dose-dependent manner in the wild-type *A. thaliana* seedling. However, the elevation in [Ca²⁺]_{cyt} was markedly suppressed in *atrbohD/f*, suggesting that both *AtrbohD* and *AtrbohF* are implicated in salt-stimulated increase in cytosolic Ca²⁺ of *Arabidopsis*. As shown in the above mentioned reports, calcium has been identified as a central regulator in different signal transduction pathways inducing antioxidant defense. Thus, it is conceivable that Ca²⁺ may function, at least in part, on induction of the antioxidant systems against ROS when *Arabidopsis* were subjected to salt stress. Hence, our results provide a pharmacological and genetic evidence for the involvement of

NADPH oxidase-dependent H_2O_2 generation in the coordination of the activities of antioxidant enzymes in *A. thaliana* under short-term salt stress treatment. However, it remains to be clarified how these secondary stress responses are affected during prolonged salt stress.

In the second part of this study, we addressed the responses of wild-type *A. thaliana* and *atrbohdf* mutant plants to long-term salinity at non-lethal concentration (100 mM NaCl). The adverse effects of salt stress on plant growth can be mainly due to: toxic effect, osmotic effect and nutritional imbalance. These in turn cause an induction of oxidative stress (Hernandez et al., 2010). In this study, the mutant *atrbohdf* growth was more inhibited than the wild-type under prolonged salt exposure (Table 1). The over salt-sensitivity in the mutant was related with higher sodium accumulation and higher Na^+/K^+ values compared to the wild-type (Table 1). Excessive accumulation of Na^+ is harmful for cell physiology and biochemistry, and could be considered as the main reason for salt toxicity. Our data further confirm recent assumptions about the involvement of AtRbohD and AtRbohF function in ROS-dependent regulation of Na^+/K^+ homeostasis in *Arabidopsis* under salt stress (Ma et al., 2012). These authors suggest that the disruption in Na^+/K^+ homeostasis is the main factor involved in the salt sensitivity of *atrbohdf* under short-term salt stress.

Under long-term NaCl treatment, F_v/F_m decreased to a higher extent in *atrbohdf* mutant than in the wild-type (Table 1), suggesting that salt-induced oxidative damage was more severe in the former genotype. MDA, the product of lipid peroxidation, has been regarded as an indicator of oxidative damage at cellular level. In this study, NaCl caused an increase in the concentration of H_2O_2 , but had no marked effect on MDA concentration in wild-type within 2 d of NaCl exposure, which should be related with the increased antioxidant enzymes activities (CAT, APX and GR) observed under these conditions (Table 2). MDA concentration increased significantly in the wild-type after exposure to 100 mM NaCl for 7 d, along with lower CAT, APX and GR activities but it has to be stated that values remained higher than that of the control (Table 2). Under short-term NaCl treatment, *atrbohdf* had markedly lower H_2O_2 and MDA concentrations than the wild-type. However, long-term NaCl treatment increased both compound levels in the former genotype, suggesting that other cellular mechanisms also contributed to H_2O_2 accumulation under prolonged salinity conditions. For instance, the wild-type and mutant plants might have used non enzymatic pathways for conversion of $O_2^{\cdot-}$ to H_2O_2 such as α -tocopherol, glutathione and ascorbate (Foyer and Noctor, 2011). It is also well known that peroxisomes provide H_2O_2 through the glycolate oxidase reaction or during β -oxidation of fatty acids (Foyer and Noctor, 2009). In addition, the more pronounced increase of H_2O_2 and MDA concentrations in *atrbohdf* genotype compared to the wild-type, together with constant CAT, APX and GR activities in the mutant (Table 2) could be explained by: (i) MDA accumulation due to the fact that cellular membranes are particularly sensitive to ROS attack and (ii) the oxidative damage resulting from an excess of ROS production following the inhibition of CAT, APX and GR activities in *atrbohdf*, likely due to post-transcriptional alteration or down regulation of gene expression. A recent study Chaouch et al. (2012) reported a lower basal *cAPX1* expression level in non-stressed *atrbohdf* mutant as compared to the wild-type. Interestingly, the relative importance of AtRbohD in *cAPX1* and CAT1 expression during light stress treatment was also pointed out (Davletova et al., 2005). Under high light conditions, the lower expression of *cAPX2* in the *atrbohdf* double mutant suggested that NADPH oxidase may be part of a signaling route controlling *cAPX2* expression (Bechtold et al., 2008), similar to that described for *cAPX1*. Silencing of *RBOH1*, the tomato homologue of AtRbohF, abolished the induction of both the gene expression and the activity of CAT, SOD, APX and GR in response to

chilling treatment (Zhou et al., 2014). In tobacco, the impairment of the *RbohD* and *RbohF* genes via antisense expression effectively decreased the mRNA levels of antioxidant enzymes including *cAPX*, catalase (CAT1 and CAT2) and cytosolic Cu/Zn SOD in response to elicitor treatment (Wi et al., 2012), which further supports our data about the likely relationship between these two rboh homologues and the induction of antioxidant enzyme activity. The difference between enzyme activities during NaCl treatment between wild-type and *atrbohdf* may also result from their impairment by H_2O_2 (Scandalios, 1993) or direct inhibition by Na^+ (Hernandez et al., 1994). Hence, it seems the wild-type is able to induce an efficient antioxidant response protecting the plant photosynthetic tissues against oxidative damage under short term exposure to salinity. Yet, long term exposure to salinity caused ROS excessive accumulation, which could not be scavenged by the antioxidant machinery (CAT, APX and GR activities declined), thereby leading to oxidative damage (as reflected by the increasing MDA concentration) and the disruption of cell structure and metabolism (Li and Yi, 2012). In view of the results observed in this experiment, it seems that significant activation of antioxidant enzymes system in wild-type *A. thaliana* undergoing short-term salt treatment might be responsible for its relative salt-tolerance under long-term treatment. In contrast, *atrbohdf* sensitivity to long-term salinity could be ascribed to the plant failure to early activate the antioxidant enzymatic system upon salt stress application but also during the experiment.

As a whole, results inferred from this work suggest that the early H_2O_2 generation by NADPH oxidase after exposure to salinity could be the beginning of a cascade of events that triggers *A. thaliana* response to salt stress at both physiological and biochemical levels. We hypothesized that the early low oxidative stress level caused by low concentration of H_2O_2 might act as an acclimation signal that triggers a preconditioning response by inducing antioxidant enzyme activities to efficiently cope with the subsequent ROS production, thereby preventing or minimizing the subsequent salt stress-derived injuries. Considering the complexity of signal transduction networks in plants, other possible pathways in the induction of the antioxidant defense system in response to salt stress cannot be ruled out. Other experiments will be needed to investigate in more detail the involvement of the NADPH oxidase-dependent H_2O_2 production in the up-regulation of the expression of antioxidant enzyme-encoding genes and possible interaction with other signaling molecules such as ABA, Ca^{2+} , CDPK, MAPK, and NO.

Acknowledgements

This work was supported by the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research (LR10CBBC02) and the Tunisian-French CMCU (Comité Mixte de Coopération Universitaire) network (13G0929). Part of this study was supported by European Union COST program FA0901 "Putting halophytes to work – From genes to ecosystem".

Chapitre V/ Article 5:

**IMPLICATION DES ESPÈCES RÉACTIVES
DE L'OXYGÈNE DANS LA RÉGULATION
DU MÉTABOLISME DE LA PROLINE**

CHAPITRE V

Implication des ERO dans la régulation du métabolisme de la proline : aspects biochimiques et moléculaires.

1. Introduction

Parmi les ERO, le H_2O_2 a été la molécule la plus étudiée pendant la phase précoce de la réponse aux contraintes biotiques et abiotiques. Le H_2O_2 est une molécule relativement stable, capable de traverser la membrane plasmique. Il est désormais évident que cette molécule joue un rôle de signalisation dans différents processus physiologiques et biochimiques. Récemment, il a été démontré aussi que l'apport exogène de H_2O_2 conduit à l'accumulation de la proline dans les coléoptiles et les racines des jeunes plantules de maïs (Yang *et al.*, 2009). Chez *A. thaliana* infiltré localement avec le couple enzymatique xanthine-xanthine oxydase (X-XO), qui produit l'anion superoxyde *in situ*, une corrélation positive a été trouvée entre le niveau de proline et les concentrations du couple (X-XO) utilisées pour l'infiltration. Quand des plantes transgéniques d'*A. thaliana* chez qui le gène *P5CS2* a été fusionné au gène rapporteur *GUS* (*AtP5CS2:GUS*) ou *LUC* (*AtP5CS2:LUC*) sont infiltrées avec (X-XO), une activité *GUS* ou la luminescence est détectée aux emplacements d'infiltration. Ces résultats indiquent que les ERO pourraient participer dans la voie de signalisation conduisant à l'accumulation de la proline lors d'une contrainte biotique (Fabro *et al.*, 2004).

2. Objectif

L'objectif principal de ce chapitre est de mieux comprendre les interactions entre le H_2O_2 et la proline à travers l'identification de la nature des connections entre la génération précoce des ERO par les NADPH oxydases et la régulation du métabolisme de la proline chez *A. thaliana* en réponse à des contraintes hydriques imposées par le NaCl ou le mannitol.

3. Méthodologie

Les graines ont été désinfectées selon la méthode décrite dans le chapitre « Matériel et Méthodes ». Les graines d'*A. thaliana* (Col-0), des mutants *atrboh*d, *atrboh*f et du double mutant *atrboh*d/f ont été semées sur des petites grilles métalliques d'environ 4,5 cm de diamètre, posées sur un milieu MS/2 (Murashige et Skoog) solidifié avec de l'agar 0,8 % (p/v). Ce milieu est enrichi en saccharose 1 % (p/v) et en vitamines Gamborg B5 1X. La croissance des plantules est menée dans une chambre de culture pendant 12 jours en éclairage continu à $90 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, et à 22° C. Pour appliquer les traitements salins ou hyperosmotiques, les grilles métalliques contenant les plantules ont été transférées vers des boîtes de Pétri de 5 cm contenant 7 mL de milieu MS/2 liquide de même composition décrite précédemment additionné de 200 mM NaCl ou avec 400 mM de mannitol.

Lors des premières séries d'expériences, nous nous sommes intéressés au suivi de la cinétique d'accumulation de la proline et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) chez des plantes d'*A. thaliana* (Col-0) soumises à une contrainte osmotique induite par le NaCl ou le mannitol. Des récoltes ont été effectuées au bout de 1, 6, 12, 18 et 24 h de traitement. Des plantes cultivées en l'absence de contrainte ont été utilisées comme témoins.

Pour les expériences basées sur l'application exogène de H_2O_2 , une gamme de 0 à 120 mM est ajoutée au milieu MS/2 liquide. Le traitement est appliqué pendant 24 h.

Une gamme de concentrations de diméthylthiourea (DMTU), de 0 à 40 mM, et de diphenyliodonium (DPI) de 0 à 40 μM , a été appliquée pour déterminer l'effet de la chélation du H_2O_2 par le DMTU et l'effet de l'inhibition des NADPH oxydases, par le DPI sur l'accumulation la proline chez des plantes cultivées en présence de NaCl (200 mM) ou de mannitol (400 mM). Les traitements ont été appliqués sur des plantes âgées de 12 jours. Des récoltes ont été effectuées au bout de 24 h de traitement. Les plantules sont prétraitées pendant 4 h dans un milieu MS/2 liquide avec l'inhibiteur ou le chélateur. Après la pré-incubation, le stress est appliqué par transfert des filtres vers d'autres boîtes de Pétri de 5 cm contenant MS/2 avec 200 mM NaCl ou avec 400 mM mannitol en présence ou en l'absence d'inhibiteurs ou de chélateur.

4. Résultats

Les résultats ont montré que le NaCl ou le mannitol conduisent à une accumulation importante de la proline, qui est précédée par une augmentation transitoire de la concentration en H_2O_2 (après 6 h de traitement). Ils montrent également qu'en l'absence de stress, l'application exogène de H_2O_2 conduit à l'accumulation de la proline chez les plantes sauvages d'*A. thaliana*. Alors que le DMTU inhibe de manière significative l'accumulation de la proline chez les plantes stressées. Ces résultats nous ont permis d'émettre une hypothèse selon laquelle le H_2O_2 peut agir comme un messenger secondaire dans les voies de signalisation conduisant à l'accumulation de la proline chez *A. thaliana* en condition de contrainte osmotique.

La détection cytochimique de H_2O_2 par microscopie électronique nous a permis de montrer que le H_2O_2 s'accumule essentiellement au niveau des parois cellulaires et dans les espaces intercellulaires à un stade précoce de la contrainte osmotique imposée par le NaCl ou le mannitol. Par conséquent, nous avons supposé que les NADPH oxydases sont impliquées dans la génération précoce de H_2O_2 qui à son tour induit l'accumulation de la proline. Cette hypothèse a été vérifiée par une approche pharmacologique. Les résultats ont montré que le DPI, inhibiteurs des NADPH oxydases, inhibe de manière significative l'accumulation de la proline chez les plantes stressées, cet effet étant dose dépendants. La toxicité pharmaceutique du DPI a été étudiée. Les résultats ont montré que l'inhibition de l'accumulation de la proline par le DPI chez les plantes traitées osmotiquement a pu être reversée après lavage des plantules et traitées de nouveau par NaCl ou par le mannitol en absence de DPI. Ces données ont montré que ce composé n'est pas toxique puisqu'il n'induit pas de létalité dans les conditions étudiées.

Nous avons également étudié la variation des niveaux des transcrits et d'accumulation des protéines P5CS et ProDH. Les résultats obtenus montrent que les niveaux des transcrits *P5CS1* et des protéines P5CS augmentent en situation de stress. La présence de DPI dans le milieu de culture en présence de NaCl ou de mannitol provoque une inhibition de l'accumulation des transcrits *AtP5CS1* et des protéines P5CS. Par contre, aucun effet n'a été observé sur le niveau de la ProDH. En outre, l'accumulation de la proline et des protéines P5CS a été évaluée chez des mutants d'*A. thaliana* affectés au niveau des NADPH oxydases

(isoformes D et F). Nos résultats ont montré que les mutants *atrboh*d et *atrboh*f accumulent beaucoup moins de proline et de protéines P5CS que les plantes sauvages. Afin de préciser le rôle du H₂O₂ intracellulaire produit par les NADPH oxydases, nous avons cherché à reverser l'effet de la mutation chez les mutants *atrboh*d et *atrboh*f par l'application exogène de 10 mM H₂O₂ en présence de 200 mM NaCl ou de 400 mM mannitol. Les résultats ont montré que le H₂O₂ exogène restaure les niveaux de l'accumulation de la proline et des protéines P5CS chez les mutants stressées à des niveaux comparables à celle des plantes sauvages cultivées en présence de NaCl ou mannitol et en absence de H₂O₂.

5. Conclusion

Nos données démontrent que les Atrbohs sont essentiels pour la production précoce de H₂O₂ qui induit l'accumulation de la proline en réponse à une contrainte osmotique chez *A. thaliana*. Ces données ont fait l'objet d'un manuscrit intitulé "*Hydrogen peroxide produced by NADPH oxidases increases proline accumulation during salt or mannitol stress in Arabidopsis thaliana*" accepté pour publication dans la revue New Phytologist.

Hydrogen peroxide produced by NADPH oxidases increases proline accumulation during salt or mannitol stress in *Arabidopsis thaliana*

Kilani Ben Rejeb^{1,2}, Delphine Lefebvre-De Vos¹, Isabel Le Disquet¹, Anne-Sophie Leprince¹, Marianne Bordenave¹, Régis Maldiney¹, Asma Jdey², Chedly Abdelly² and Arnould Savouré¹

¹Adaptation des Plantes aux Contraintes Environnementales, Case 156, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, 4 place Jussieu, F-75005 Paris, France; ²Laboratoire des Plantes Extrêmophiles, Centre de Biotechnologie de Borj-Cedria (CBBC), BP 901, Hammam-Lif 2050, Tunisia

Author for correspondence:

Arnould Savouré

Tel: +33 01 44 27 26 72

Email: arnould.savoure@upmc.fr

Received: 19 March 2015

Accepted: 8 June 2015

New Phytologist (2015)

doi: 10.1111/nph.13550

Key words: abiotic stresses, *Arabidopsis thaliana*, cell signalling, hydrogen peroxide (H₂O₂), NADPH-oxidases (Rboh), proline metabolism.

Summary

• Many plants accumulate proline, a compatible osmolyte, in response to various environmental stresses such as water deficit and salinity. In some stress responses, plants generate hydrogen peroxide (H₂O₂) that mediates numerous physiological and biochemical processes. The aim was to study the relationship between stress-induced proline accumulation and H₂O₂ production.

• Using pharmacological and reverse genetic approaches in *Arabidopsis thaliana*, we investigated the role of NADPH oxidases, Respiratory burst oxidase homologues (Rboh), in the induction of proline accumulation was investigated in response to stress induced by either 200 mM NaCl or 400 mM mannitol.

• Stress from NaCl or mannitol resulted in a transient increase in H₂O₂ content accompanied by accumulation of proline. Dimethylthiourea, a scavenger of H₂O₂, and diphenylene iodonium (DPI), an inhibitor of H₂O₂ production by NADPH oxidase, were found to significantly inhibit proline accumulation in these stress conditions. DPI also reduced the expression level of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, the key enzyme involved in the biosynthesis of proline. Similarly, less proline accumulated in knockout mutants lacking either *AtRbohD* or *AtRbohF* than in wild-type plants in response to the same stresses.

• Our data demonstrate that *AtRboh*s (*A. thaliana* Rboh) contribute to H₂O₂ production in response to NaCl or mannitol stress to increase proline accumulation in this plant.

Introduction

In their natural environments, plants commonly encounter a variety of abiotic constraints such as drought and salinity (Nakashima *et al.*, 2009). To overcome these constraints, plants have developed a variety of adaptive mechanisms that allow them to perceive external signals and to optimize adaptive responses. One of these mechanisms is osmotic adjustment through the accumulation of large quantities of osmolytes, as it allows plants to avoid water-deficit stress by maintaining water uptake. Glycine betaine, polyols, sugars and free amino acids are examples of such osmolytes (Chen & Jiang, 2010; Slama *et al.*, 2015).

Proline is the most common free amino acid to accumulate in plants subjected to water-deficit stress. However, proline has multifunctional roles which do not necessarily relate to the osmotic balance (for review, see Szabados & Savouré, 2010): it may stabilize protein complexes, scavenge free radicals and be a source of carbon and nitrogen for growth after stress relief. Not only that, proline biosynthesis and degradation are involved in regulating

intracellular redox potential and storage, as well as the transfer of energy and reducing power (Szabados & Savouré, 2010; Sharma *et al.*, 2011). The beneficial effect of proline on plant growth after stress is likely to be the result of changes in proline metabolism rather than the accumulation of the amino acid itself (Szabados & Savouré, 2010; Sharma *et al.*, 2011).

The proline content of plant cells depends on tight regulation of its proline biosynthesis and catabolism. Housekeeping levels of proline biosynthesis occur in the cytosol, but stress-induced biosynthesis is thought to be localized in chloroplasts (Székely *et al.*, 2008). When under water-deficit stress, proline is mainly synthesized from glutamate. The bifunctional pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) reduces glutamate to glutamyl-5-semialdehyde, which is spontaneously converted to pyrroline-5-carboxylate (P5C). P5C is then reduced to proline by P5C reductase (P5CR). Degradation of proline takes place in mitochondria via the sequential action of proline dehydrogenase (ProDH) and P5C dehydrogenase. The rate-limiting steps in proline biosynthesis and degradation are catalyzed by P5CS and

ProDH, respectively. Two closely related P5CS-encoding genes were identified in *Arabidopsis thaliana*. *P5CS1* is induced by drought and salt stress (Savouré *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 1995), whereas *P5CS2* is expressed in dividing cells in cell suspension cultures (Strizhov *et al.*, 1997), in meristematic and reproductive tissues (Székely *et al.*, 2008), and in response to biotic stress such as incompatible plant–pathogen interactions (Fabro *et al.*, 2004). Similarly, *A. thaliana* has two genes for ProDH, *ProDH1* and *ProDH2* (Kiyosue *et al.*, 1996; Verbruggen *et al.*, 1996; Funck *et al.*, 2010). *ProDH1* is thought to encode the main isoform involved in proline degradation (for review see Servet *et al.*, 2012). The expression of *ProDH1* is downregulated by osmotic stress and upregulated by proline (Kiyosue *et al.*, 1996; Verbruggen *et al.*, 1996).

The regulation of *P5CS* and *ProDH* expression has been studied to identify components of signalling pathways that control proline accumulation. Under nonstress conditions, phospholipase D functions as a negative regulator of proline biosynthesis in *Arabidopsis* (Thiery *et al.*, 2004), whereas calcium signalling and phospholipase C (PLC) trigger *P5CS1* transcription and proline accumulation during salt stress (Parre *et al.*, 2007). *P5CS1* expression has also been found to be stimulated by light (Hayashi *et al.*, 2000) and nitric oxide (Zhao *et al.*, 2009), and it is abscisic acid (ABA)-independent under water-deficit stress (Savouré *et al.*, 1997; Sharma & Verslues, 2010). Recently Leprince *et al.* (2015) demonstrated that phosphatidylinositol 3-kinase is involved in the regulation of proline catabolism through the transcriptional regulation of *ProDH1*.

Another common plant response to all types of environmental constraints is the accumulation of reactive oxygen species (ROS), which are toxic at high concentrations but at lower concentrations may act as signal molecules in the control of various cellular processes. Hydrogen peroxide (H_2O_2) is a ROS produced by plant plasma membrane-localized NADPH oxidases, known as respiratory burst oxidase homologues (Rbohs). Rbohs reduce molecular oxygen to superoxide by oxidising NADPH via FAD and two hemes. The superoxide primary product is then converted into H_2O_2 by superoxide dismutase (Sagi & Fluhr, 2001, 2006). The *Arabidopsis* genome contains 10 NADPH oxidase-encoding genes, designated *AtRbohA* to *J*, that exhibit different patterns of expression throughout plant development and in response to environmental factors (Fluhr, 2009; Marino *et al.*, 2012). For instance, *AtRbohA*, *B* and *C* are only expressed in roots, especially in the elongation zone. *AtRbohC* was specifically identified as playing a role in root hair development (Foreman *et al.*, 2003). *AtRbohH* and *J* are reported to be expressed only in pollen. Both *AtRbohD* and *AtRbohF* are expressed in all plant organs and are the main isoforms involved in pathogen defence responses (Torres *et al.*, 2002), ABA-induced stomatal closure (Kwak *et al.*, 2003), jasmonic acid signalling regulated by transcription factor MYC2 (Maruta *et al.*, 2011) and ROS-dependent regulation of Na^+/K^+ homeostasis under salt stress (Ma *et al.*, 2012). *AtRbohD* has also been demonstrated to mediate rapid systemic signalling triggered by multiple abiotic stresses (Miller *et al.*, 2009) and to be required for salt acclimation signalling mediated by heme oxygenase in

Arabidopsis (Xie *et al.*, 2011). It was reported that mild salt stress causes a rapid and transient accumulation of ROS in *A. thaliana* (peak I after 1 h) followed by a second oxidative burst (peak II after 6 h) (Xie *et al.*, 2011). The conclusion is that HY1 heme oxygenase plays an important role in salt acclimation signalling and requires the participation of *AtRbohD*-derived ROS from peak II. More recently, it has been reported that *AtRbohF* fulfils a crucial role in protecting shoot cells from transpiration-dependent accumulation of excess Na^+ (Jiang *et al.*, 2012). Rbohs are thus key regulators of ROS production with pleiotropic functions in plants.

It is possible that there is a link between quantitative changes in ROS and proline. Exogenous H_2O_2 treatment led to a significant accumulation of proline in coleoptiles and radicles of maize seedlings due to the induction of biosynthetic P5CS enzyme activity and a decrease in catabolic ProDH enzyme activity (Yang *et al.*, 2009). Fabro *et al.* (2004) have also demonstrated that ROS can mediate the activation of *AtP5CS2* and proline accumulation during biotic stress. However, reports on the relationship between endogenous ROS increase and proline accumulation under osmotic stress are still limited and the link between NADPH oxidases and proline accumulation has never been addressed. In the present study, the role of ROS-generating NADPH-oxidase enzymes in proline accumulation in response to salt or mannitol stress was investigated in *Arabidopsis thaliana* seedlings.

Materials and Methods

Growth conditions and stress treatments

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh ecotype Columbia-0 (Col-0) was used as the wild-type in this study. Homozygous *A. thaliana* transposon insertion mutant lines *atrbohD-3* (European Arabidopsis Stock Centre code N9555) and *atrbohF-3* (European Arabidopsis Stock Centre code N9557) and double mutant *atrbohD/f* (European Arabidopsis Stock Centre code N9558) (Torres *et al.*, 2002) were ordered from the European Arabidopsis Stock Centre. Homozygous T-DNA insertion lines SALK_070610 (*atrbohD*, seventh exon insertion) and SALK_059888 (*atrbohF*, third intron insertion) were ordered from the Salk collection (Pogany *et al.*, 2009) and used as controls for the transposon insertion lines.

Surface-sterilized seeds of wild-type (Col-0) and *Arabidopsis* mutant plants were sown onto grids placed on 0.5× Murashige and Skoog (MS) solid agar medium in Petri dishes according to Parre *et al.* (2007). After 24 h at 4°C to break dormancy, seedlings were allowed to grow at 22°C under continuous light (90 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Twelve-day-old *Arabidopsis* seedlings were exposed to H_2O_2 (5–120 mM), paraquat (PQ, also called methyl viologen, 5–120 μM), 200 mM NaCl or 400 mM mannitol for 24 h. To alter ROS concentrations, the seedlings were preincubated for 4 h without or with H_2O_2 scavenger dimethylthiourea (DMTU, 5–40 mM) or flavoenzyme inhibitor diphenylene iodonium (DPI, 5–40 μM) in 0.5× liquid MS medium and then exposed to either NaCl or mannitol for 24 h.

Determination of ion content

Whole plants were harvested, rinsed twice in pure water and quickly blotted. Samples were dried at 60°C until they reached constant weight and then ground. Ions were extracted from samples in 0.5% HNO₃. Na⁺ and K⁺ were assayed by flame emission photometry (Corning Medical and Scientific, Halstead, Essex, UK).

Proline content measurements

Free proline content was measured according to the Bates method (Bates *et al.*, 1973). Powdered plant samples (50–100 mg) were homogenized in 1.5 ml of 3% sulfosalicylic acid and centrifuged at 14 000 g for 10 min at 4°C. To 1 ml of this extract, 1 ml of acid-ninhydrin and 1 ml of glacial acetic acid were added. The reaction mixture was incubated at 100°C for 1 h then placed on ice to stop the reaction. In the presence of proline, the reaction produces a red chromogen; the chromogen was extracted with 2 ml of toluene and the absorbance of the resulting upper phase was read at 520 nm. The proline content of samples was calculated by referring to a standard curve drawn from absorbance readings from samples containing known concentrations of proline.

H₂O₂ concentration measurements

H₂O₂ concentration was determined in a horseradish peroxidase-based spectrophotometric assay following the protocol described by Oracz *et al.* (2009). Plant samples (300 mg FW) were ground in a mortar on ice in 1 ml of 0.2 M perchloric acid. After 15 min of centrifugation at 13 000 g at 4°C, the resulting supernatant was neutralized to pH 7.5 with 4 M KOH and then centrifuged at 13 000 g at 4°C. The concentration of H₂O₂ in the supernatant was immediately determined by adding peroxidase with substrates 3-dimethylaminobenzoic acid and 3-methyl-2-benzothiazolidone hydrazone. The increase in absorbance at 590 nm was monitored for 15 min after the addition of peroxidase at 25°C and compared with a calibration curve obtained with known amounts of fresh H₂O₂.

Histochemical detection of H₂O₂

The production of H₂O₂ was visualized *in vivo* by 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCFDA) or 3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining methods. Arabidopsis roots were collected after 6-h treatments and immersed in 25 µM H₂DCFDA for 15 min in the dark and then washed with 20 mM potassium phosphate buffer pH 6. Fluorescent signals were visualized using a Zeiss ApoTome microscope (excitation, 488 nm; emission, 525 nm). DAB staining was performed as described by Torres *et al.* (2002). Leaves from PQ-treated seedlings were detached and vacuum infiltrated with DAB solution (1 mg ml⁻¹ DAB-HCl, pH 3.8). DAB forms a reddish-brown polymer in the presence of H₂O₂ formation. After staining, leaves were cleared in 96% boiling ethanol and observed using a binocular microscope. For both

staining methods, digital images were obtained with an AxioCam camera and AxioVision software (Zeiss).

Cytochemical detection of H₂O₂

Cytochemical detection of H₂O₂ was carried out according to the method described by Bestwick *et al.* (1997). Leaf samples were collected from treated and control seedlings, and incubated in freshly prepared 5 mM cerium chloride for 30 min. The leaves were then fixed in a solution containing 4% glutaraldehyde and 1.5% paraformaldehyde for 1 h, post-fixed for 45 min in 1% osmium tetroxide and then embedded in Eponaraldite resin after dehydration in an ethanol series. Sections (60–80-nm thick) were cut with an LKB 2128 ultramicrotome, mounted on uncoated copper grids, and stained with 5% uranyl acetate. Sections were observed using a Zeiss912 Omega transmission electron microscope. Digital images were obtained using a Veleta Camera (2kx2k; Olympus) and ITEM software (Zeiss).

Reverse transcription PCR and quantitative reverse transcription PCR analysis

Total RNA was extracted from 100 mg of plant tissue ground in liquid nitrogen using a mixer mill (MM301; Retsch, Haan, Germany). The powder was suspended in 0.5 ml extraction buffer (0.2 M Tris-HCl, 0.5% (v/v) SDS, 0.25 M NaCl, 25 mM EDTA) and mixed with 0.5 ml of phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1, v/v). The aqueous phase was extracted three times with phenol:chloroform:isoamylalcohol. Total RNA was then precipitated overnight on ice with 2 M LiCl. After centrifugation (15 min, 10 000 g), the pellet was resuspended in 2 M LiCl and left to precipitate for 6 h on ice. Traces of DNA were removed by DNase treatment. The RNA content was quantified by measuring the absorbance at 260 nm using a Nanovue[®] spectrophotometer (GE Healthcare Life Science, Piscataway, NJ, USA). First-strand cDNA was obtained from 1.5 µg of total RNA using Rev-ertAid[™] reverse transcriptase synthesis kit (Fermentas, Piscataway, NJ, USA) and oligo(dT)23 as primer.

For reverse transcription (RT)-PCR, cDNAs were amplified using Taq polymerase and gene-specific primers (Supporting Information Table S1). *APT1* (adenine phosphoribosyltransferase 1; At1g27450) gene transcripts were amplified as a control. Amplified PCR fragments were visualized using ethidium bromide stained 2% (w/v) agarose gels. RT-PCR signals were quantified using IMAGEJ 1.48 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

For quantitative (q)PCR, 5 µl of diluted cDNA was used with 10 µl of Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas) and gene-specific primers (Table S1) in a Mastercycler[®] ep realplex (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Critical thresholds (C_t) were calculated using Realplex 2.0 software (Eppendorf). For each gene, a standard curve made with dilutions of cDNA pools was used to calculate the reaction efficiencies, and relative expressions were calculated according to Hellemans *et al.* (2007) with *APT1* (At1g27450) and *AT5G* (At5g13440) as

housekeeping genes. A mixture of cDNAs corresponding to each sample was used as reference. All qRT-PCR experiments were carried out with three biological replicates.

Western blots

Total protein extracts were subjected to sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) using 8% acrylamide resolving gels and electroblotted onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Rabbit polyclonal antibodies raised against P5CS or ProDH were used as primary antibodies (Thierry *et al.*, 2004; Parre *et al.*, 2007). Blots were incubated with secondary horseradish peroxidase-conjugated antibodies (GE Healthcare Life Sciences). The highly sensitive ECL Prime detection system (GE Healthcare) was used to quantify proteins using IMAGEJ 1.48 software (National Institutes of Health) after densitometric scanning of autoradiography films. Alternatively the Storm 840 FluorImager (GE Healthcare Life Science) was used to visualise and quantify proteins on blots.

Statistical analysis

A one-way ANOVA at $P < 0.05$ significance level was performed using SPSS (IBM Inc., Chicago, IL, USA) for Windows. The Duncan post-hoc test was used to test for significant differences between treatments.

Results

Kinetics of ROS and proline accumulation in wild-type *A. thaliana* seedlings

In order to investigate ROS and proline accumulation in response to stress induced by either salt or mannitol, 12-d-old *A. thaliana* seedlings were exposed to 200 mM NaCl or 400 mM

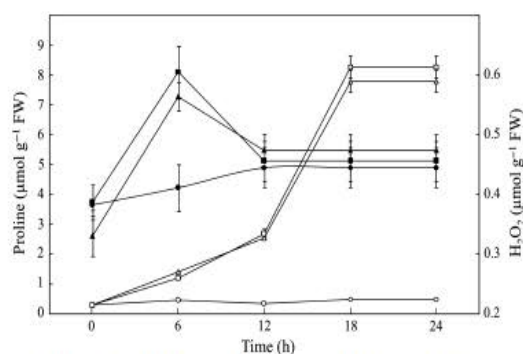


Fig. 1 NaCl and mannitol stresses trigger transient increases in hydrogen peroxide (H_2O_2 , closed symbols) and proline (open symbols) accumulation. Twelve-day-old wild-type *Arabidopsis thaliana* seedlings grown on $0.5 \times$ Murashige and Skoog (MS) solid medium were transferred to $0.5 \times$ MS liquid medium for treatment. Plants were then exposed to 200 mM NaCl (triangles), 400 mM mannitol (squares) or neither (circles) for 24 h. The results shown are the means of at least three independent experiments (\pm SE).

mannitol for up to 24 h. In both cases proline started to accumulate after 6 h. A maximum 16-fold increase in proline content was reached after 18 h of NaCl or mannitol stress (Fig. 1). A transient increase in H_2O_2 content was also observed in stressed seedlings after 6 h. H_2O_2 content had returned to a basal level after 12 h.

Effect of H_2O_2 and paraquat on proline accumulation in *A. thaliana*

The kinetics of H_2O_2 and proline accumulation in response to either NaCl or mannitol stress showed that proline had already started to increase 6 h after stress was applied when the transient increase in H_2O_2 content was also observed (Fig. 1). To determine whether H_2O_2 could be involved in proline accumulation, we first investigated whether adding different concentrations of exogenous H_2O_2 would affect proline accumulation in *A. thaliana*. Results showed that proline accumulation is induced by exogenous H_2O_2 application, with 10 mM H_2O_2 having the maximum effect (Fig. 2a).

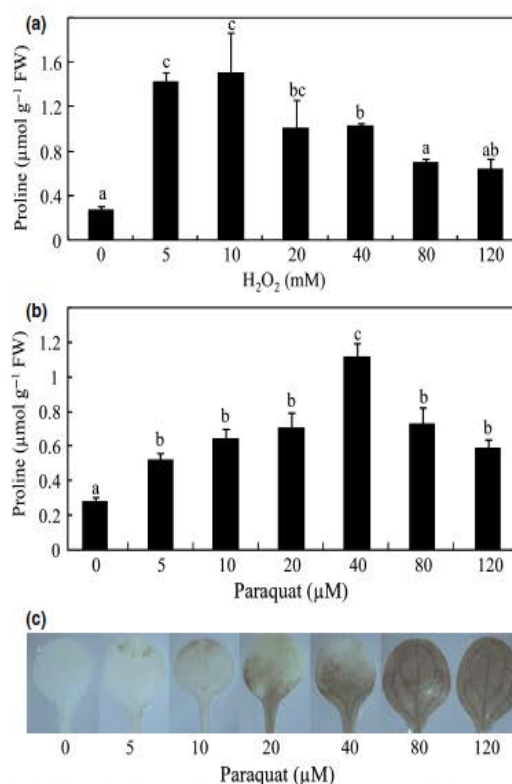


Fig. 2 Hydrogen peroxide (H_2O_2) induces proline accumulation. Proline accumulation in wild-type *Arabidopsis thaliana* seedlings treated with (a) H_2O_2 and (b) paraquat for 24 h. Means (\pm SE) of at least three independent experiments with different letters are significantly different at $P < 0.05$. (c) H_2O_2 was visualized by using 3,3'-diaminobenzidine staining in *A. thaliana* leaves exposed to different concentrations of paraquat for 24 h.

The herbicide PQ induces superoxide anions and subsequently H_2O_2 generation *in situ*. Like H_2O_2 , PQ also stimulated proline accumulation in *Arabidopsis* seedlings in a dose-dependent manner, with 40 μM PQ having the maximum effect (Fig. 2b). Leaves treated with high concentrations of PQ (80 or 100 μM) started to bleach after 48 h of treatment due to the high amount of H_2O_2 generated (data not shown), even though proline contents were not higher than at 40 μM PQ. DAB staining revealing the presence of H_2O_2 in leaves demonstrates that exogenously applied PQ gives rise to H_2O_2 *in situ* in a dose-dependent manner (Fig. 2c). Taken together, these results indicate a possible causal relationship between H_2O_2 and proline production. However, much less proline accumulated in the presence of 10 mM H_2O_2 (about five times less) or 40 μM PQ (about eight times less) than with NaCl or mannitol stress (Figs 1, 2a,b).

Effect of DMTU, a chemical scavenger of H_2O_2 , on proline accumulation in response to stress

In order to investigate whether the induction of proline accumulation by salt or mannitol requires H_2O_2 , we treated *A. thaliana* seedlings with DMTU, a chemical trap for H_2O_2 . As shown in Fig. 3(a), addition of up to 40 mM DMTU inhibited proline accumulation in a dose-dependent manner in seedlings treated with NaCl and to a lesser extent in those treated with mannitol.

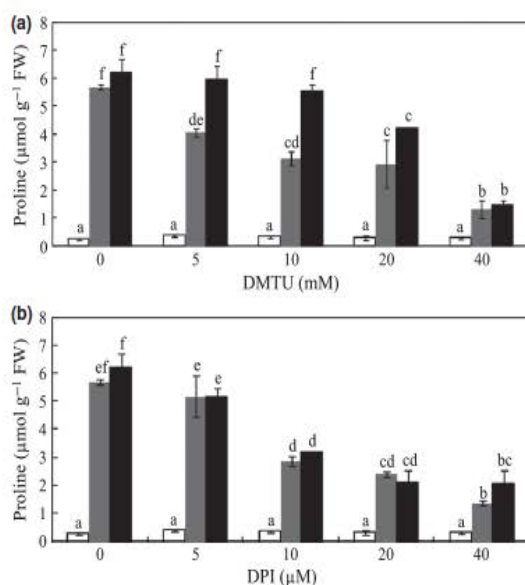


Fig. 3 The NADPH oxidase inhibitor diphenylene iodonium (DPI) and the hydrogen peroxide (H_2O_2) scavenger dimethylthiourea (DMTU) affect proline accumulation induced by salt or mannitol stress. Twelve-day-old *Arabidopsis thaliana* seedlings grown on 0.5 \times Murashige and Skoog (MS) solid medium were transferred to 0.5 \times MS liquid medium for treatment. Plants were preincubated with various concentrations of (a) DMTU or (b) DPI for 4 h and then exposed to 200 mM NaCl (grey bars), 400 mM mannitol (black bars) or neither (white bars) for 24 h. Means (\pm SE) of three independent experiments with different letters are significantly different at $P < 0.05$.

Subcellular localization of H_2O_2 accumulation

Multiple sources of H_2O_2 production inside plant cells have been described (Petrov & Van Breusegem, 2012). To investigate the subcellular localization of H_2O_2 accumulation in leaves of *A. thaliana* seedlings, a cytochemical approach using cerium perhydroxide was taken (Bestwick *et al.*, 1997). No visible cerium perhydroxide deposits were observed at the subcellular level in *A. thaliana* leaves growing under normal growth conditions, indicating the absence of H_2O_2 using this detection method (Fig. 4). However, both salt and mannitol triggered H_2O_2 accumulation in cell walls of mesophyll cells. Importantly no cerium perhydroxide deposits were observed in the cytosol, chloroplasts or mitochondria indicating that no major H_2O_2 accumulation occurred in these organelles.

NADPH oxidases are essential for proline accumulation in response to NaCl and mannitol stresses

Stress-induced H_2O_2 accumulated in the cell wall and apoplasm. The main source of cell wall H_2O_2 is the plasma membrane-bound NADPH oxidase (Petrov & Van Breusegem, 2012). We therefore hypothesized that NADPH oxidase activity is required for proline accumulation in response to salt and mannitol stress. We investigated this using a pharmacological approach. Treatments of *A. thaliana* seedlings with DPI, an inhibitor of flavin enzymes such as NADPH oxidases, resulted in a dose-dependent decrease of proline accumulation induced by salt and mannitol stress (Fig. 3b). Addition of various concentrations of DPI did not affect proline accumulation in seedlings growing under normal growth conditions. For further experiments we used 20 μM DPI, which diminished proline accumulation by c. 60%. To aid interpretation of results, the pharmaceutical toxicity of DPI was also tested in seedlings. As shown in Fig. 5, the reduction of proline accumulation caused by the addition of 20 μM DPI to NaCl- and mannitol-treated seedlings for 24 h was totally reversed after washing the seedlings and putting them back in growth medium. In addition no leaf injury or lethality was observed for any treatment.

We monitored H_2O_2 production in root tips by adding H_2DCFDA , which reacts with H_2O_2 in living cells to produce fluorescent DCF. As observed in whole seedlings, H_2O_2 is detected in root tips 6 h after exposure to either NaCl or mannitol (Fig. 6a). By contrast H_2O_2 was not detected in root tips incubated with DPI before treatment with either NaCl or mannitol prevented, suggesting that H_2O_2 production was inhibited.

The rate-limiting steps in proline biosynthesis and degradation in *Arabidopsis* are catalyzed by P5CS and ProDH, respectively. To further investigate the role of NADPH oxidase in proline metabolism, steady-state transcript levels of *AtP5CS1* and *AtProDH1* were investigated. Semi-quantitative RT-PCR analysis showed that DPI treatment significantly decreased *P5CS1* transcript levels in response to salt and, to a lesser extent, mannitol (Fig. 6c). Steady-state transcript levels of *ProDH1* gene were not altered by DPI. Protein concentrations of P5CS and ProDH were also investigated by Western blot analyses. In wild-type

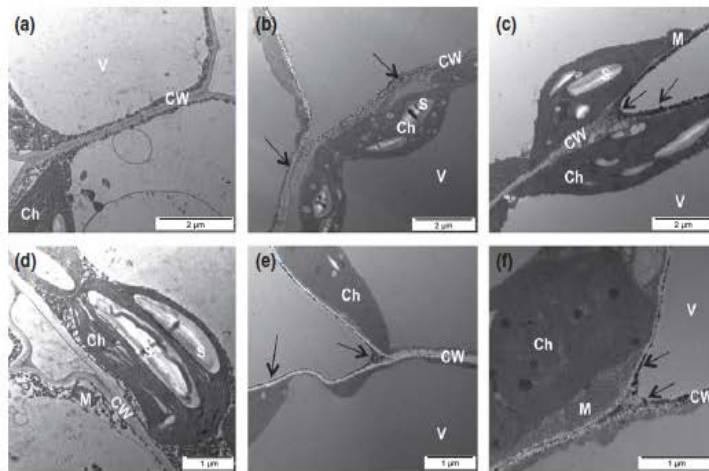


Fig. 4 NaCl and mannitol stresses trigger apoplastic hydrogen peroxide (H_2O_2) accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. Twelve-day-old seedlings grown on $0.5\times$ Murashige and Skoog (MS) solid medium were transferred to $0.5\times$ MS liquid medium. Subcellular localization of H_2O_2 was detected by CeCl_3 staining of leaves of wild-type *A. thaliana* grown under normal conditions (control; a, d) or in the presence of either (b, e) 200 mM NaCl or (c, f) 400 mM mannitol for 6 h. Arrows indicate electron-dense deposits of cerium perhydroxides formed in the presence of H_2O_2 and CeCl_3 . Ch, chloroplast; CW, cell wall; V, vacuole; S, starch; M, mitochondria.

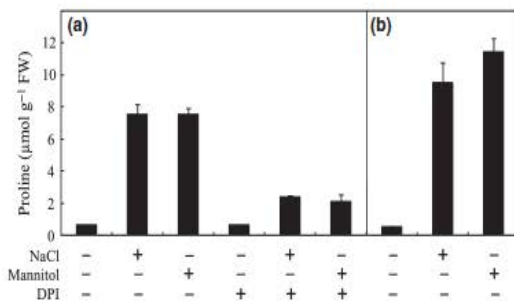


Fig. 5 Inhibition of proline accumulation by diphenylene iodonium (DPI) can be reversed. *Arabidopsis thaliana* seedlings were pretreated with 20 μM DPI as described in Fig. 3 and then treated with either 200 mM NaCl or 400 mM mannitol for 24 h (a). Seedlings were then washed twice and transferred onto NaCl or mannitol medium for another 24 h (b). Means (\pm SE) of three independent experiments with different letters are significantly different at $P < 0.05$.

A. thaliana plants, 200 mM NaCl and 400 mM mannitol both caused an increase in P5CS protein concentration compared with untreated plants (Fig. 6d). However, the increase in P5CS protein concentrations by salt or mannitol was markedly suppressed by pretreating seedlings with DPI. In contrast to ProDH, whose protein concentrations were unaffected by the different conditions, a good correlation was observed between P5CS transcript levels and protein amounts, and proline content.

Proline accumulation in *atrboh* mutants

If ROS produced by NADPH oxidase is involved in regulating proline accumulation due to NaCl and mannitol stress, then knockout (KO) mutants defective in NADPH oxidase would be expected to accumulate less proline than wild-type plants. Of the 10 *Arabidopsis* NADPH oxidase genes identified, *AtRbohD* and *AtRbohF* are the only ones expressed in all plant organs and they are implicated in abiotic stress physiology (Fluhr, 2009; Marino *et al.*, 2012). *AtRbohD-3* and *atrbohF-3* mutants were therefore selected for our study. Semi-quantitative RT-PCR using wild-type and mutant plants revealed that

rbohd-3 and *rbohf-3* homozygous plants contained no detectable levels of *AtRbohD* and *AtRbohF* transcripts in response to salt treatment (data not shown). In both *atrbohD-3* and *atrbohF-3* mutants, the transient increase in H_2O_2 concentrations at 6 h in response to NaCl and mannitol stresses was not as large as the wild-type increase (Fig. 7). After cerium perhydroxide staining, no visible cerium perhydroxide deposits were observed in the leaves of *atrbohD* mutant seedlings grown under mannitol or salt stress, indicating the absence of detectable concentrations of H_2O_2 (Fig. S1).

The two NADPH oxidase-deficient *atrbohD* and *atrbohF* mutants were examined for the accumulation of proline and P5CS protein in response to either mannitol or salt stress. As expected, application of 200 mM NaCl or 400 mM mannitol induced proline accumulation in wild-type *Arabidopsis* plants (Fig. 8a). Consistent with the results of DPI treatment in wild-type plants (see Fig. 6), *atrbohD-3* and *atrbohF-3* mutants accumulated less proline and less P5CS protein than the wild-type in the presence of 200 mM NaCl (Fig. 8a,b). The results of 400-mM mannitol treatments were similar although less pronounced (Fig. 8a,b). Similar results for proline accumulation were observed with independent alleles of *atrbohD* and *atrbohF* (T-DNA insertion lines SALK_070610 and SALK_059888, respectively) (Fig. S2). In the double *atrbohD* mutant proline amounts reached similar levels to those in the single mutants in response to mannitol stress (Fig. 8). The amount of proline that accumulated in response to NaCl in the double mutant was slightly higher but was not as high as the amount induced in the wild-type. It was noted that the decrease in proline and P5CS accumulation was less pronounced in the *atrboh* mutants than in seedlings treated with DPI (Figs 5, 6). Perhaps NADPH oxidases other than *AtRbohD* and *AtRbohF* or other sources of H_2O_2 are involved in the regulation of proline biosynthesis. To further demonstrate a role for H_2O_2 , we reversed the effect of *atrboh* mutation by applying exogenous H_2O_2 . Addition of 10 mM H_2O_2 restored the levels of proline and P5CS protein accumulation in mannitol-treated *atrbohD-3*, *atrbohF-3* and double *atrbohD* seedlings (Fig. 8).

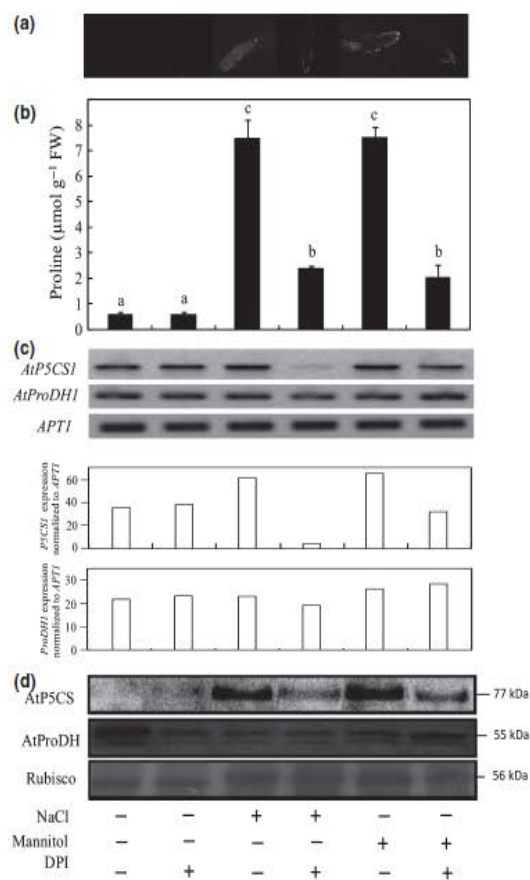


Fig. 6 Diphenylene iodonium (DPI) inhibition of NADPH oxidase activity affects proline metabolism induced by either salt or osmotic stress. *Arabidopsis thaliana* seedlings were prepared and treated as previously described in Fig. 3. (a) Sites of hydrogen peroxide (H₂O₂) production visualized by using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate in wild-type *A. thaliana* root tips pretreated with 20 μM DPI and grown under normal conditions or in the presence of either 200 mM NaCl or 400 mM mannitol for 6 h. (b) Proline accumulation in wild-type seedlings pretreated with 20 μM DPI and grown under normal conditions or in the presence of either 200 mM NaCl or 400 mM mannitol for 24 h. Means (± SE) of three independent experiments with different letters are significantly different at *P* < 0.05. (c) Reverse transcription (RT)-PCR analysis of *P5CS1* and *ProDH1* expression. RT-PCR was performed using total RNAs extracted from seedlings treated for 24 h as described in (b). *APT1* transcripts were amplified as an internal control. Lower panels, quantification of the expression of *P5CS1* and *ProDH1* normalized to *APT1*. (d) Western blot of pyruvate-5-carboxylate synthetase (P5CS) and ProDH proteins from seedlings treated for 24 h as described in (b). Rubisco revealed by Ponceau-S staining of all protein was used as a loading control.

Discussion

Plant stress tolerance involves diverse mechanisms such as signal perception and transduction, osmolyte accumulation, ion homeostasis, growth regulation and cellular protection from damage triggered by reactive oxygen species (ROS). It is widely accepted that H₂O₂ and other ROS are also important signalling

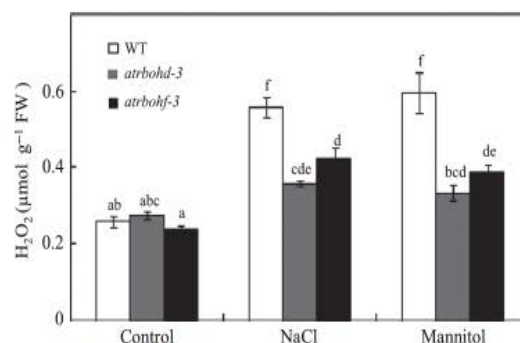


Fig. 7 AtRbohD and AtRbohF are required for transient hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation induced by salt or mannitol stress. *Arabidopsis thaliana* seedlings were prepared and treated as described in the legend of Fig. 3. H₂O₂ accumulation was measured in seedlings of wild-type (WT) and the transposon insertion mutants *atrboh-3* and *atrbohF-3* at 6 h after stress treatment with either 200 mM NaCl or 400 mM mannitol. Means (± SE) of three independent experiments with different letters are significantly different at *P* < 0.05.

molecules in the activation of defence genes in response to biotic stress (Foyer & Noctor, 2009; Bartoli *et al.*, 2012). The connection between ROS and proline in response to biotic stress has already been highlighted by Fabro *et al.* (2004). Nevertheless, little is known about the involvement of ROS in the regulation of proline metabolism in response to abiotic stresses. The aim of our work was to evaluate the roles of H₂O₂ in the regulation of proline metabolism in response to two different abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. Our results showed that both NaCl and mannitol stress induced proline accumulation and a transient increase in H₂O₂ content (Fig. 1). The timing of these changes might suggest that H₂O₂ could act as a secondary messenger involved in triggering proline biosynthesis. This hypothesis is supported by the observation that treatment with H₂O₂ or paraquat (PQ) also promoted proline accumulation (Fig. 2). However, these effects are not as strong as those caused by physiological NaCl or mannitol stresses. The fact that much less proline accumulated in response to H₂O₂ and PQ than to the stress conditions is in itself intriguing. One possibility is that additional signalling pathways are involved in the full stress response. Phospholipase D enzymes are putative signalling components as they have been previously shown to negatively regulate proline accumulation in nonstress or mild stress conditions (Thierry *et al.*, 2004). Following this reasoning, phospholipase D activity may need to be inhibited in order to elicit a full proline stress response by H₂O₂ treatment. As H₂O₂ is able to increase proline accumulation and DMTU is an effective inhibitor of proline accumulation induced by NaCl or mannitol, our data suggest that the stress-induced proline accumulation observed in *A. thaliana* seedlings is mediated at least partly by H₂O₂.

ROS, such as singlet oxygen (¹O₂), H₂O₂ and hydroxyl radical (OH[•]), are produced during normal aerobic metabolism in different cell compartments such as cell walls, plasma membranes, chloroplasts, mitochondria and peroxisomes (Dat *et al.*, 2000). The production of H₂O₂ has been repeatedly demonstrated at

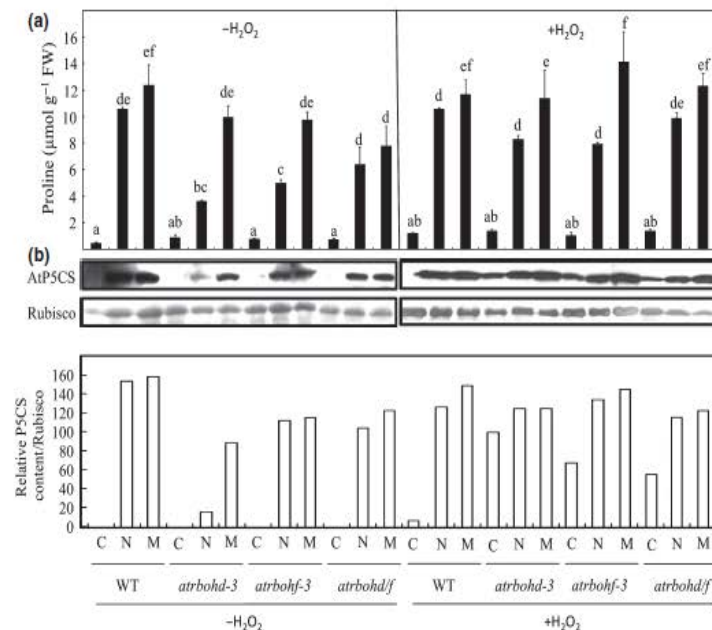


Fig. 8 AtRbohD and AtRbohF are essential for proline accumulation in response to either NaCl or mannitol. *Arabidopsis thaliana* seedlings were prepared and treated as previously described in the legend of Fig. 3. (a) Proline accumulation was determined in transposon insertion mutant lines *atrboh-3*, *atrboh-3* single mutants and in the *atrboh-3/f* double mutant in comparison to wild-type (WT) seedlings grown under normal conditions or in the presence of either 200 mM NaCl or 400 mM mannitol for 24 h. Proline content was also measured in wild-type and mutant seedlings grown in the same condition after application of 10 mM hydrogen peroxide (H₂O₂). Means (\pm SE) of three biological replicates with different letters were significantly different at $P < 0.05$. (b) Western blot of pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) proteins from seedlings treated as described in (a). Rubisco revealed by Ponceau-S staining of all proteins was used as loading control. Quantification of the western blot normalized to Rubisco is shown as a bar graph. C, control; N, NaCl; M, mannitol.

the subcellular level by using CeCl₃ techniques, for example, during abscisic acid signalling (Hu *et al.*, 2006), pathogen attack (Bestwick *et al.*, 1997), responses to ozone (Pellinen *et al.*, 1999), drought (Hu *et al.*, 2006), anoxia (Blokina *et al.*, 2001) and heavy metal excess (Romero-Puertas *et al.*, 2004). Our observation based on CeCl₃ detection revealed that either salt or mannitol stress induced H₂O₂ accumulation in walls of mesophyll cells (Fig. 4). H₂DCFDA fluorescence analysis also revealed an accumulation of H₂O₂ in Arabidopsis root tips in response to either NaCl or mannitol stress (Fig. 6). This is consistent with a report that H₂O₂ accumulation was detected along the plasma membrane of maize leaves challenged with abscisic acid and water-deficit stress (Hu *et al.*, 2006). Using CeCl₃, we did not detect any H₂O₂ in chloroplasts or in any other organelle of *A. thaliana* leaf cells after 6 h of either salt or mannitol treatment. The apoplastic oxidative burst and resultant H₂O₂ accumulation in the extracellular space is characteristic of plant cells exposed to biotic and abiotic stresses (Bartoli *et al.*, 2012). Studies of different plant species have demonstrated the action of plasma membrane-bound NADPH oxidases in the apoplastic ROS-producing system during early oxidative bursts; these are critical in plant signalling and development, including in defence, root hair development, stomatal closure and early responses to salt stress (Torres *et al.*, 2002; Foreman *et al.*, 2003; Kwak *et al.*, 2003; Leshem *et al.*, 2007). Diphenylene iodonium (DPI) is a commonly used

potent inhibitor of flavin enzymes such as NADPH oxidase. We found that DPI efficiently inhibited H₂O₂ production in *A. thaliana* seedling roots exposed to NaCl or mannitol (Fig. 6a), strongly suggesting that at least some of the H₂O₂ production induced by salt or mannitol originates from NADPH oxidase.

In response to either salt or mannitol stress, *P5CS1* proline biosynthesis transcript and protein amounts rose with increasing proline accumulation. Pretreatment of *A. thaliana* seedlings with DPI reduced the salt- or mannitol-induced proline accumulation in a dose-dependent manner (Fig. 6). In addition, DPI significantly diminished *P5CS1* transcript and protein accumulation. The reaction catalysed by NADPH oxidase uses O₂ to generate superoxide (O₂⁻), which is then converted into H₂O₂ by apoplastic superoxide dismutase. H₂O₂, as a nonpolar molecule, can easily pass through the plasma membrane, probably via aquaporins. H₂O₂ has important roles as a signalling molecule in the regulation of a variety of biological processes. Possibly by redox changes H₂O₂ might directly or indirectly activate unknown signalling components, such as transcription factors, to regulate the transcription of proline biosynthesis genes.

The role of respiratory burst oxidase homologues (Rbohs) in the regulation of proline metabolism was further investigated by reverse genetic approach using *atrboh-3* and *atrboh-3/f* knock-out (KO) mutants. Compared with the wild-type, the strong

reduction of H_2O_2 production after 6 h in the *atrboh*d mutant in response to NaCl and mannitol, observed to a lesser extent in the *atrboh*f, could be considered to be consistent with *AtRbohD* being the most highly expressed member of the *AtRboh* gene family in response to salt (Leshem *et al.*, 2007). Furthermore, the cytochemical detection of H_2O_2 indicated that H_2O_2 production during salt and mannitol stress is associated with *AtRbohD* expression.

Our study shows that proline accumulation was 20-fold higher in salt-treated than control wild-type plants; however, it was only five-fold and nine-fold higher in salt-treated *atrboh*d and *atrboh*f seedlings (respectively) compared with their controls. The double *atrboh*d/f mutant surprisingly produced slightly more proline in response to NaCl than the corresponding single mutants, possibly because the double mutant is more sensitive to NaCl. Similarly, a much lower PSCS content was observed in the *atrboh*d mutant, compared with only a marginal reduction in *atrboh*f mutants compared with wild-type plants. Taken together, these results indicate that these NADPH oxidase isoforms are involved in proline accumulation during salt stress, with *AtRbohD* having a prominent role. It was noted that the decrease in proline accumulation was more pronounced in wild-type seedlings treated with DPI than in *atrboh* mutants. This result would implicate other NADPH oxidases in the proline accumulation response. Indeed, according to qPCR measurements, *AtRbohA*, *AtRbohB* and *AtRbohC* transcripts are more abundant in *atrboh*d and *atrboh*f mutants than in wild-types under stress, which is possibly preliminary evidence of a feedback mechanism in these mutants (Fig. S3).

Recently, it has been demonstrated that ROS generated by *AtRbohF* have a specific and predominant role in regulating Na^+ accumulation and soil-salinity tolerance (Jiang *et al.*, 2012). When grown in saline soil, *atrboh*f mutants accumulated higher concentrations of Na^+ than wild-type plants. In addition, Ma *et al.* (2012) have suggested that *AtRbohF* acts redundantly with *AtRbohD* in regulating Na^+/K^+ homeostasis. These independent observations lead us to postulate that the difference in proline accumulation in wild-types and *atrboh* mutant plants could result from impaired Na^+/K^+ regulation. No differences in Na^+ and K^+ content were found between *atrboh*d, *atrboh*f and wild-type plants subjected to NaCl treatment for 24 h (Fig. S4). However, the double *atrboh*d/f mutant contained less Na^+ but had a higher $\text{Na}^+ : \text{K}^+$ ratio. Differences in Na^+ accumulation in *atrboh* single mutants between our study and the study of Jiang *et al.* (2012) were probably due to large differences in growth and stress conditions in the two experimental systems, such as continuous light vs 16 h : 8 h light : dark cycles or short vs long durations of stress. However, the regulation of proline accumulation by *Rboh* in Arabidopsis was probably mainly due to the osmotic stress component of salt stress rather than to the ionic component, because *Rboh* was involved in the response to both NaCl and mannitol stress. Lastly, because the generation of ROS by *Rboh* causes changes in the cell redox potential, we postulate that redox-sensitive signalling components or transcription factors may be activated and to influence the expression of proline biosynthesis genes.

In conclusion, our results shed new light on the regulation of proline metabolism in response to abiotic stresses showing the involvement of NADPH oxidase and H_2O_2 . We show that H_2O_2 is involved in proline accumulation induced by salt and mannitol stresses. First, proline accumulation was preceded by elevated H_2O_2 concentrations, and scavenging of H_2O_2 by DMTU abolished proline accumulation. Second, we have presented evidence that NADPH oxidases are the potential source of the observed stress-induced H_2O_2 generation. Third, the absence of H_2O_2 production in cell walls and the accumulation of less proline in *atrboh*d and *atrboh*fKO mutants in response to NaCl and mannitol provides convincing genetic evidence that the corresponding NADPH oxidase isoforms contribute to proline accumulation.

Acknowledgements

We thank the IFR 83 Electron Microscopy Service of the CNRS Institute of Integrative Biology (UPMC, Paris, France) for use of transmission electron microscopy facilities. We thank Christophe Bailly for valuable scientific discussion and advice on ROS measurements and Alban Launay and Pierre Carol for critical reading of the manuscript. K.B.R. was supported by a PhD scholarship from the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research (LR10CBBC02) and the Tunisian-French CMCU (Comité Mixte de Coopération Universitaire) network (29174UF). Part of this study was supported by European Union COST program FA0901 'Putting halophytes to work – from genes to ecosystem'.

Supporting Information

Fig. S1

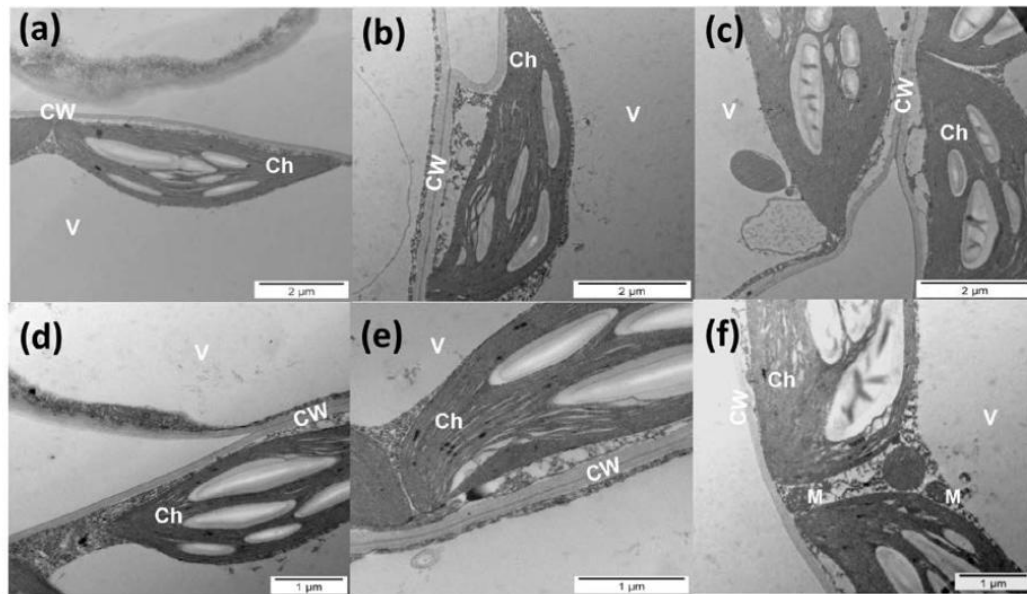


Fig. S1 Early apoplastic H_2O_2 accumulation is mediated through plasma membrane-bound NADPH oxidases in leaves of *A. thaliana* in response to either NaCl or mannitol. *atrbohD* mutant was grown and treated as described in Fig. 4. Subcellular localization of H_2O_2 in *atrbohD* mutant grown under (a, d) normal conditions or in the presence of either (b, e) 200 mM NaCl or (c, f) 400 mM mannitol for 6 h. No electron-dense deposits of cerium perhydroxides were observed. Ch, chloroplast; CW, cell wall; V, vacuole; S, starch; M, mitochondria.

Fig. S2

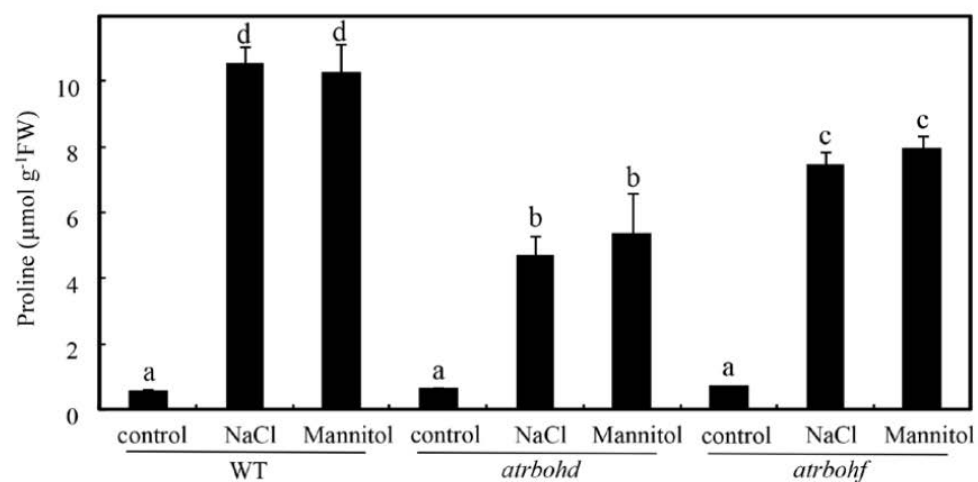


Fig. S2 Proline accumulation in *atrboh* insertion lines. Twelve-day-old seedlings grown on 0.5× MS solid medium were transferred to 0.5× MS liquid medium for treatment. Proline accumulation in T-DNA insertion lines *atrbohδ* and *atrbohδ* in comparison to wild-type grown under normal conditions or in the presence of either 200 mM NaCl or 400 mM mannitol for 24 h. Means (\pm SE) of three independent experiments with different letters are significantly different at $P < 0.05$.

Fig. S3

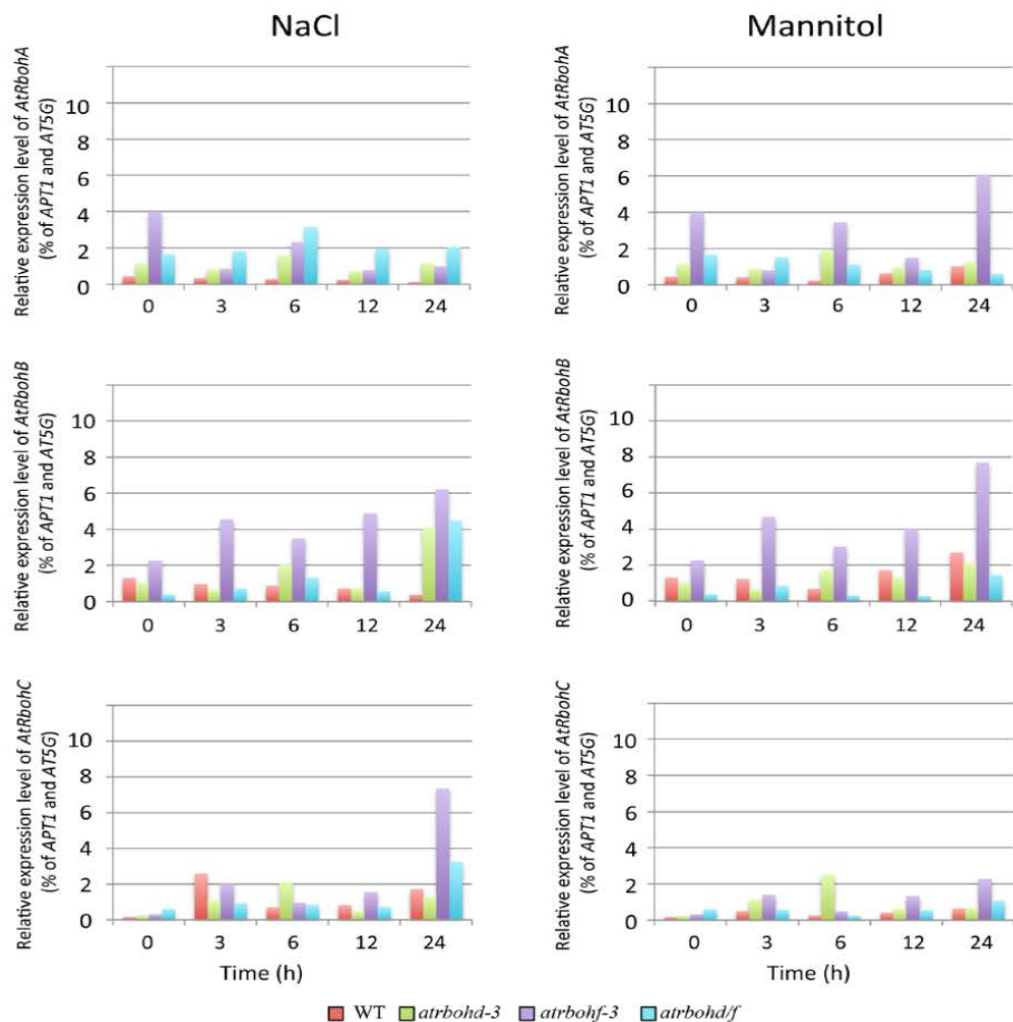


Fig. S3 qRT-PCR analysis of differential expression of three *AtRboh* genes in wild-type (WT) and *atrbohD* and *atrbohF* mutants. These genes were prioritized for study based on their expression pattern and previous physiological or genetic studies. These genes were prioritized for study based on their expression pattern and previous physiological or genetic studies. Expression levels of *AtRbohA*, *AtRbohB* and *AtRbohC* by RT-qPCR on cDNA obtained from 0 to 24 h 200 mM NaCl- and 400 mM mannitol-treated WT and *atrbohD*, *atrbohF* and *atrbohD/f* mutants. Transcript levels of individual genes are given as percentage of the constitutive *AtAPT1* and *AT5G* gene expression level.

Fig. S4

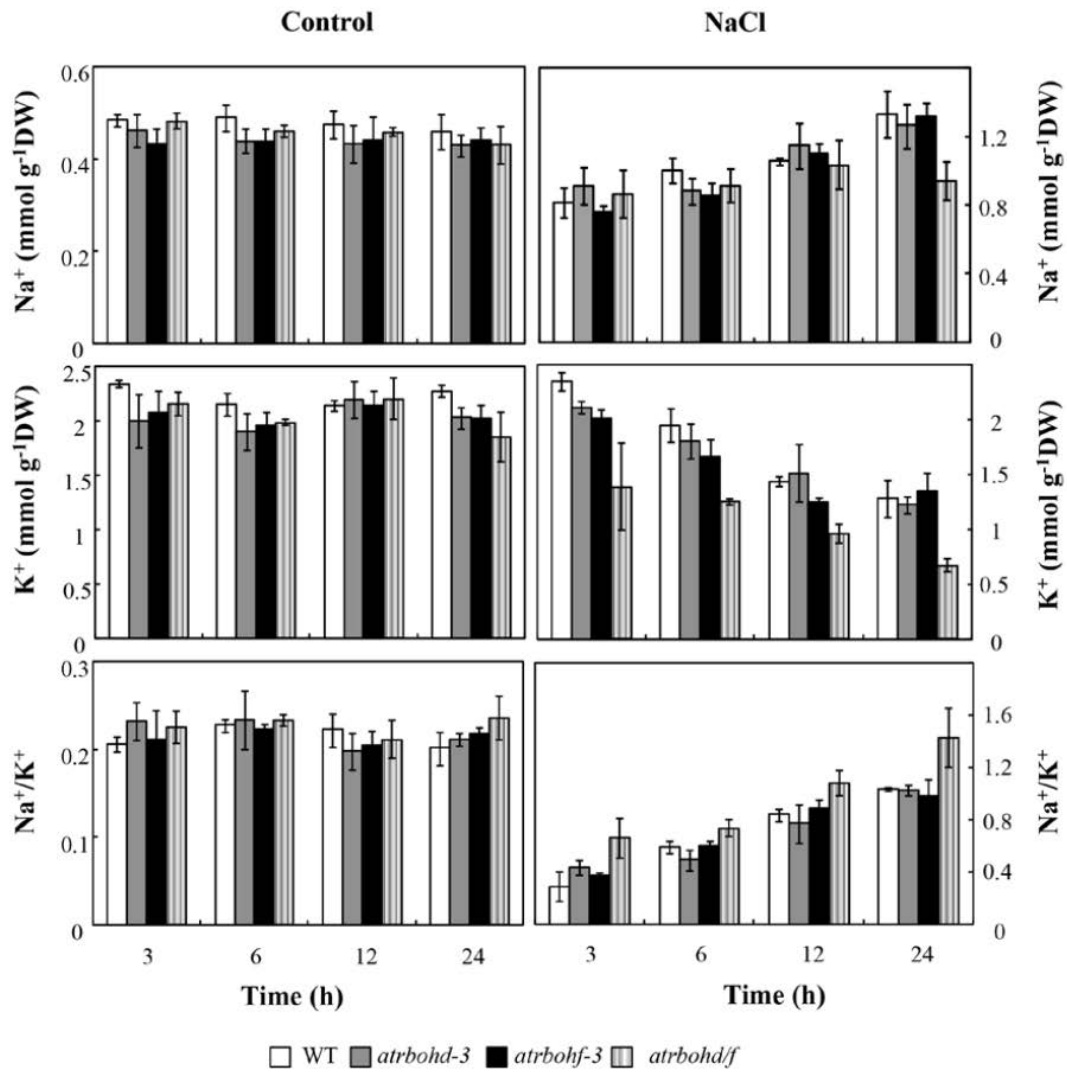


Fig. S4 Changes in Na^+ and K^+ content and $\text{Na}^+ : \text{K}^+$ ratios in Arabidopsis wild-type (WT) and *atrboh*d and *atrboh*f mutants upon NaCl stress. Twelve-day-old seedlings of Arabidopsis WT, *atrboh*d-3, *atrboh*f-3 and *atrboh*d/f were exposed to 200 mM NaCl during 24 h, and then plants were collected for measuring their ion contents. Results shown are mean (\pm SE) of three independent experiments.

Table S1 List of primers used for RT-PCR and qRT-PCR analysis

Gene	Gene reference	Use	Forward primer	Reverse primer
<i>AtP5CS1</i>	At2g39800	RT-PCR	GAGCTAGATCGTTCACGTGCTTT	ACAACTGCTGTCCCAACCTTAAC
<i>AtProDH1</i>	At3g38710	RT-PCR	GCCACAGGAAATGTTCTTACC	GAAGACACAGGAGATAAATGTGTT
<i>AtrbohA</i>	At5g07390	qRT-PCR	AGGGGTCGTTTGACTGGTTC	CTCGTAAACGCTGGTGCACT
<i>AtrbohB</i>	At1g09090	qRT-PCR	CGAGGTGATGGGCTACTGTG	TGTTCTACAAACGGGCAAG
<i>AtrbohC</i>	At5g51060	qRT-PCR	CGTGGACCTCACGGTAGATG	GACGGTTTCGTTTCAGCAAA
<i>AtrbohD</i>	At5g47910	qRT-PCR	GCTCCGTGCTTTCAGATCAA	TTTGAATCCTTGTGGCTTCG
<i>AtrbohE</i>	At1g19230	qRT-PCR	CACGAGAGGAAATAGCTGCG	AATCGTCTCGGGCGAGTAAT
<i>AtrbohF</i>	At1g64060	qRT-PCR	CAGAACTTGACCAACGGGGT	AGAGCAGAACGAGCATCACC
<i>AtrbohJ</i>	At3g45810	qRT-PCR	GGGAGGCTTCCCAAGGATAA	GAGATCCTTCTTGATCATGTCTTC
<i>APT1</i>	At1G27450	RT- and qRT-PCR	ACGACGCTTCTTCTCGACAC	CACCAATAGCCAACGCAATAG
<i>AT5G</i>	At5G13440	RT- and qRT-PCR	ACAAGCCAATTTTGTGCTGAGC	ACAACAGTCCGAGTCTCATGGT

DISCUSSION GÉNÉRALE

Discussion générale

L'altération de l'activité photosynthétique et les dommages oxydatifs expliquent en partie l'hypersensibilité au sel du mutant d'*A. thaliana* *p5cs1-4* déficient dans la synthèse de la proline.

L'accumulation de la proline en réponse à des contraintes environnementales variées, notamment les contraintes hydrique et saline, est généralement considérée comme une réponse adaptative permettant aux plantes de survivre dans des conditions très défavorables (Hayet et al., 2012). Il a été démontré que, chez *A. thaliana*, le mutant d'insertion *p5cs1-4* produit très peu de proline et manifeste une sensibilité accrue à la salinité quand il est soumis à 200 mM NaCl pendant 24 h (Székely et al., 2008). Nos données ont montré également que le mutant *p5cs1-4* est plus sensible à la contrainte saline que le sauvage quand ils sont soumis à 100 mM NaCl pendant 10 jours. Nos résultats montrent également que la pulvérisation foliaire de 10 mM de proline permet d'atténuer l'effet inhibiteur de la croissance induit par le NaCl chez les deux génotypes, et plus particulièrement chez le mutant *p5cs1-4*. Ces résultats sont en concordance avec des travaux antérieurs portant sur des plantes transgéniques d'*Arabidopsis* exprimant un gène antisens de *P5CS1* (Nanjo et al., 1999). Ces auteurs ont montré que ces plantes sont incapables de croître sur des milieux salins et que l'addition de la L-proline augmente leur capacité de tolérance au sel.

Les effets du sel sur les plantes peuvent être divisés en trois catégories: (i) effet toxique (due à l'accumulation des ions Na^+ et Cl^-), (ii) effet osmotique et (iii) perturbations nutritionnelles, auxquelles s'ajoutent des effets secondaires dus à l'accumulation des ERO (Munns and Tester, 2008). La salinité affecte principalement la croissance des plantes par une accumulation des ions Na^+ à des niveaux toxiques et une restriction de l'absorption des éléments nutritifs. Nos résultats montrent qu'en présence de NaCl dans le milieu de culture aucune différence du rapport Na^+ / K^+ n'est observée entre les deux génotypes, ce qui suggère que l'hypersensibilité du mutant *p5cs1-4* au sel n'est pas due à des perturbations de l'homéostasie Na^+ / K^+ . De même, nos résultats montrent qu'en condition de contrainte saline, aucune différence n'est observée entre les deux génotypes tant au niveau de l'hydratation des feuilles (CRE) qu'au niveau de potentiel osmotique (Ψ_π), et ceci malgré les taux élevés de

proline observés chez les plantes sauvages par rapport aux mutants. Ces résultats suggèrent que l'hypersensibilité du mutant au sel par rapport au sauvage n'est pas due à des perturbations osmotiques. Ainsi, chez *A. thaliana* la proline aurait joué un rôle autre que l'ajustement osmotique.

En condition de contrainte saline, l'accumulation excessive des ions Na^+ et Cl^- conduit à des perturbations des processus photochimiques de la photosynthèse (Munns and Tester, 2008). Une réduction importante de l'assimilation nette de CO_2 (A) et de la conductance stomatique (g_s) a été observée chez les plantes sauvages d'*A. thaliana* et celles du mutant *p5cs1-4* traitées par le sel, avec un effet plus prononcé chez le dernier. D'après notre étude il semble que la proline est directement impliquée dans la protection de l'appareil photosynthétique. Cette hypothèse a été soutenue par les valeurs élevées des teneurs en Chl et A enregistrées chez les plantes sauvages par rapport à celles du mutant *p5cs1-4*, ainsi que l'effet positif de la proline exogène chez les mutants *p5cs1-4* traités par le sel. Plusieurs auteurs ont rapporté que l'apport exogène de la proline est capable d'améliorer la capacité photosynthétique chez plusieurs espèces végétales soumises à des contraintes environnementales variées (Hayet et al., 2012). La proline peut améliorer la photosynthèse en conditions de stress par le maintien de la stabilité des membranes et la conformation des protéines, telle que la RuBisCo (Solomon et al. 1994; Szabados and Saviouré 2010). Une autre explication probable des effets bénéfiques de la proline sur la conductance stomatique peut être liée au rôle de la proline comme un soluté compatible impliqué dans l'ajustement osmotique. Celui-ci permet de maintenir la turgescence des cellules pendant un stress osmotique, et permet de ce fait, de maintenir au moins les stomates partiellement ouverts ce qui autorise la poursuite de l'assimilation de CO_2 .

L'efficacité photochimique maximale du PSII (F_v / F_m) est un paramètre qui permet la détection des dommages du photosystème PSII et l'induction éventuelle de la photoinhibition. D'après nos résultats, on observe une diminution importante de F_v / F_m chez les mutants *p5cs1-4* par rapport aux plantes sauvages traitées par 100 mM NaCl, ce qui indique que ces plantes ont subi une photoinhibition importante due à l'accumulation des ERO. La mesure de la concentration en MDA a montré que les plantes sauvages qui accumulent plus de proline, accumulent moins de MDA que les mutant *p5cs1-4* traitées par le sel. L'apport exogène de la proline améliore la performance du PSII et réduit la teneur en MDA chez le mutant *p5cs1-4*.

Ces résultats fournissent des arguments supplémentaires sur le rôle possible de la proline qui protège les cellules contre les dommages oxydatifs liés aux ERO. Une corrélation négative entre la peroxydation des lipides et l'accumulation de la proline a été observée chez la canne à sucre transgénique sur-exprimant le gène *P5CS1* de la vigne (*Vigna aconitifolia*) (Molinari et al., 2007), suggérant que l'accumulation de la proline pourrait agir en tant que composante du système de défense antioxydant et atténuer les effets délétères du stress oxydatif induit par les contraintes osmotiques. Nos résultats montrent que les activités enzymatiques de la CAT, APX et GR augmentent d'une manière significative chez les plantes sauvages traitées par le NaCl par rapport aux plantes témoins et ont été renforcées par l'apport exogène de la proline. Chez le mutant *p5cs1-4*, on enregistre une faible activité des enzymes clés du cycle ascorbate-gluthathion (APX et GR), conduisant à une intensification des dommages oxydatifs. La proline jouerait donc le rôle d'une molécule antioxydante et/ou stabiliserait l'activité des enzymes impliquées dans la défense contre le stress oxydatif.

Genèse des ERO et implication dans la régulation de la capacité antioxydante

Diverses contraintes environnementales conduisent à la génération des ERO comme le H_2O_2 . Ces ERO sont généralement toxiques pour les plantes, mais à faible concentration ils peuvent jouer le rôle de molécule 'signal'. Afin de maintenir un équilibre entre la production et la détoxification des ERO, les plantes ont développé plusieurs mécanismes antioxydants. Nos résultats montrent que le traitement des plantes sauvages d'*A. thaliana* pendant 24 h conduit à une production transitoire de H_2O_2 à 6 h. Chez les plantes, il existe plusieurs sites de production de H_2O_2 tels que les chloroplastes, les mitochondries, les peroxisomes, les NADPH oxydases, les peroxidases et les amines oxydases. Chez *A. thaliana*, Leshem et al. (2007) ont montré que les NADPH oxydases localisées au niveau des membranes plasmiques, sont les principales sources de production de H_2O_2 à un stade précoce de la réponse à la contrainte saline. La NADPH oxydase conduit les électrons du NADPH à l'oxygène moléculaire pour former l'anion superoxide (O_2^-), qui sera rapidement dismuté en H_2O_2 par la SOD. Nos résultats montrent qu'en présence de NaCl, le pic d'accumulation de H_2O_2 coïncide avec une activité élevée de la SOD, ce qui suggère que l'augmentation de l'activité de cette enzyme est due partiellement à l'augmentation de l'activité des NADPH oxydases. Une

augmentation transitoire de l'activité SOD a été observée chez l'orge pendant la phase précoce de la réponse au sel (Maksimovic et al., 2013). Chez le mutant d'*A. thaliana* déficient pour la NADPH oxydase, une réduction importante de l'activité SOD a été observée en réponse à l'arsenic (As) par rapport aux plantes sauvages. D'après nos résultats, nous avons également constaté que lorsque les plantes sauvages d'*A. thaliana* sont prétraitées avec 20 μ M DPI ou 10 mM imidazole, deux inhibiteurs de la NADPH oxydase, l'augmentation transitoire de l'activité de la SOD et de l'accumulation de H_2O_2 à 6 h liées à la présence de sel a été supprimée, ce qui suggère que la production transitoire de H_2O_2 induite par le sel est due au moins partiellement aux activités des NADPH-oxydases.

La diminution de la concentration de H_2O_2 chez les plantes traitées au sel a été associée à une augmentation de l'activité des CAT, APX et GR. Par conséquent, nous avons émis une hypothèse selon laquelle la production précoce de H_2O_2 chez *A. thaliana* en réponse à la contrainte saline pourrait servir de messager secondaire pour induire les activités des CAT, APX et GR. Cette hypothèse a été soutenue par le fait que le prétraitement avec 40 mM DMTU, un chélateur chimique de H_2O_2 ou le DPI, conduit à des faibles activités de CAT, APX et GR en réponse à 200 mM NaCl par rapport aux plantes non prétraitées. En outre, aucune production précoce de H_2O_2 ou induction des activités APX, GR et CAT n'a été observée chez le double mutant *atrbohdf* nul pour les homologues RBOHD et RBOHF de la NADPH oxydase. Nos résultats démontrent grâce à une approche pharmacologique associée à une approche génétique l'implication de la NADPH oxydase dans la génération précoce de H_2O_2 , ce dernier coordonnant les activités d'enzymes antioxydantes chez *A. thaliana* soumise à la contrainte saline. Compte tenu des résultats obtenus par l'analyse physiologique et biochimique de la réponse du mutant *atrbohdf* à la contrainte saline prolongée, il semble que l'activation précoce des enzymes antioxydantes chez les plantes sauvages pourrait être responsable de sa tolérance relative à la contrainte saline à long terme. En revanche, la sensibilité du mutant *atrbohdf* à la contrainte saline prolongée pourrait être attribuée à une incapacité d'induction de ces activités antioxydantes.

Implication du H_2O_2 générée par les NADPH oxydases dans l'accumulation de la proline par le NaCl ou le mannitol chez *A. thaliana*.

La relation entre l'accumulation des ERO et la proline en réponse aux contraintes biotiques a déjà été mise en évidence par Fabro et al. (2004). Néanmoins, il y a peu de données sur leur relation en réponse aux contraintes abiotiques.

Lors des premières séries d'expériences, nous nous sommes intéressés au suivi de la cinétique d'accumulation de la proline et du H_2O_2 chez des plantes sauvages d'*A. thaliana* soumises à une contrainte osmotique induite par le NaCl ou par le mannitol. Une accumulation du H_2O_2 a été observée chez les plantes stressées qui précède l'accumulation de la proline. Ces résultats suggèrent que le H_2O_2 peut agir comme un messager secondaire pour induire l'accumulation de la proline chez *A. thaliana* en condition de stress osmotique. Pour vérifier cette hypothèse, une série d'expériences a été réalisée pour déterminer l'effet de la chélation du H_2O_2 par le diméthylthiourea (DMTU) et l'effet de l'inhibition d'une source interne de production de H_2O_2 en tant que molécule signal, la NADPH oxydase, par le diphenyleneiodonium (DPI) sur l'accumulation de la proline chez des plantes cultivées en présence de NaCl (200 mM) ou de Mannitol (400 mM). Les résultats ont montré que la présence de DPI ou DMTU dans le milieu de culture inhibe l'accumulation de la proline chez les plantes stressées.

En utilisant des anticorps spécifiques, les niveaux de P5CS, l'enzyme clé de biosynthèse de la proline, et de ProDH, enzyme clé de catabolisme de cet acide aminé, ont été également suivis. Une bonne corrélation a été observée entre l'accumulation de la proline et l'accumulation de P5CS. Le niveau de P5CS augmente après 24 h de traitement chez les plantes traitées par le NaCl ou par le mannitol par rapport aux plantes témoins et une diminution du niveau des protéines a été observée après le traitement avec le DPI. Par contre, aucun effet n'a été observé sur le niveau de la ProDH. Par ailleurs, la toxicité pharmaceutique du DPI a été étudiée. Les résultats ont montré que l'inhibition de l'accumulation de la proline par le DPI chez les plantes traitées osmotiquement a pu être reversée après lavage des plantules et traitées de nouveau par NaCl ou par le mannitol et en absence de DPI. Ces données ont montré que ce composé n'est pas toxique puisqu'il n'induit pas de létalité dans les conditions étudiées. Pour mieux étudier le rôle de H_2O_2 dans le métabolisme de la proline, nous avons évalué aussi l'effet du DPI au niveau transcriptionnel de *AtP5CS1* par RT-PCR. Les contraintes ioniques et/ou hyperosmotiques imposées respectivement par NaCl ou par le mannitol ont entraîné une augmentation des niveaux du transcrit *P5CS1* après 24 h de

traitement. Lorsque les plantes traitées osmotiquement ont été incubées avec 20 μ M DPI pendant 24 h, une importante diminution des niveaux des transcrits a été observée. Cette approche pharmacologique a été vérifiée par une approche génétique en utilisant des mutants homozygotes d’NADPH oxydase (Rboh, Respiratory Burst Oxidase Homolog). L’étude des mutants *atrbohD* et *atrbohF* a montré que le niveau de la proline et P5CS diminue chez le mutant *atrbohD* par rapport aux plantes sauvages (Col-0) traitées par 200 mM NaCl ou 400 mM mannitol.

En conclusion, nos résultats présentent de nouvelles données sur la régulation du métabolisme de la proline en réponse aux contraintes abiotiques, avec la participation de la NADPH oxydase et de H₂O₂.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Conclusions et perspectives

Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire avaient comme objectifs de caractériser les relations entre l'accumulation de la proline et les ERO en condition de contrainte hydrique chez la plante modèle *A. thaliana*.

Dans la première partie de la présente étude (chapitre 3), les données physiologiques et biochimiques obtenues sur le mutant *p5cs1-4* nous ont permis de démontrer que la proline joue un rôle important dans le système de défense antioxydant. La proline agirait comme piègeur des ERO, et stimulerait également l'activité d'enzymes antioxydantes. Le métabolisme de la proline est aussi dans certains cas associé à la réduction de l'accumulation des ERO ce qui permet à la cellule de mieux résister aux conséquences de ces ERO, tel que la photoinhibition. Les résultats obtenus au cours du quatrième chapitre nous ont aussi permis de démontrer que la génération précoce de H₂O₂ par les NADPH oxydases lors d'une contrainte hydrique imposée par le NaCl pourrait être le début d'une cascade d'événements qui déclenche des réponses adaptatives chez *A. thaliana* tel que l'induction des enzymes antioxydantes. Les résultats issus de la seconde partie (chapitre 5) ont par ailleurs fourni des informations nouvelles en ce qui concerne la relation entre la génération précoce de H₂O₂ et l'accumulation de la proline chez *A. thaliana*. On a pu montrer par des approches pharmacologiques et de génétique inverse que le H₂O₂ produit par les NADPH oxydases (*Atrboh*) régule positivement la biosynthèse de la proline lors d'un stress hyperosmotique chez *A. thaliana*.

Les perspectives immédiates liées à cette étude sont multiples et variées. Dans les résultats présentés et discutés dans le chapitre 3, nous avons observé que chez le mutant *p5cs1-4* il n'y a pas d'induction des activités des enzymes APX et GR lors d'une contrainte saline. La détermination de l'accumulation du glutathion et des niveaux de transcrits *APX* et *GR* chez ce mutant peut nous apporter des informations importantes sur la relation entre la proline et le cycle acrobate-glutathion.

Etant donné que l'enzyme P5CS1 a une localisation chloroplastique lors d'une contrainte saline, il serait intéressant d'étudier la relation entre la déficience de l'accumulation de la proline chez le mutant *p5cs1-4* et l'accumulation des ERO dans les chloroplastes en lien avec l'activité des différents isoformes de ces enzymes antioxydantes liées à ces organites.

Dans le chapitre 4, nous avons démontré que la génération précoce de H₂O₂ par les NADPH oxydases a un impact sur les enzymes antioxydantes chez *A. thaliana* en condition de contrainte saline. Compte tenu de la complexité des réseaux de transduction du signal chez les plantes, d'autres voies possibles dans l'induction du système de défense antioxydant en réponse au stress salin ne peuvent pas être exclues. D'autres expériences seront nécessaires pour étudier de manière plus détaillée l'implication des NADPH oxydases dans la régulation de l'expression des gènes codant pour les enzymes antioxydantes et la possible interaction avec d'autres molécules de signalisation telles que l'ABA et NO.

Les voies de signalisation impliquées dans la régulation du métabolisme de la proline n'ont été que très partiellement identifiées et caractérisées. Il serait important d'étudier les composantes impliquées dans la transduction des signaux aboutissant à l'accumulation de la proline lors d'une contrainte hydrique, celles qui sont en amont et en aval des NADPH oxydase comme la phosphatidylinositol3-kinase (PI3K). Ces voies de signalisation PI3K participent à la régulation du trafic vésiculaire du H₂O₂ en réponse à une contrainte saline (Leshem et al., 2007). En réponse à une contrainte biotique, il a été démontré que chez *A. thaliana*, l'activation du gène *P5CS2* et la synthèse de proline est régulé positivement par le SA en utilisant les ERO comme signal intermédiaire (Fabro et al., 2004). D'autre part, en analysant le métabolisme de la proline à un stade précoce de la réponse hypersensible (HR) contre l'attaque par un agent pathogène chez *A. thaliana*, Cecchini et al. (2011) montrent que l'activité ProDH est nécessaire au développement de la HR. L'induction de l'expression ProDH1 serait dépendante de SA et l'activité ProDH serait associée à une accumulation des ERO qui sont supposés intervenir directement dans la mort cellulaire. Des travaux récents (Krinke et al., 2009) basés sur des analyses de transcriptomes dans les cellules en suspension d'*A. thaliana* ont permis de montrer que les phospholipases D sont impliquées dans les premières étapes de la signalisation de l'acide salicylique. Compte tenu des différents rôles attribués à la proline, l'ensemble de ces données suggère que ces voies de signalisation liées au SA et aux phospholipases pourraient être impliquées dans la régulation du métabolisme de la proline en condition de stress osmotique et après la levée du stress (réhydratation).

Les perspectives à plus long terme concerneraient une étude de l'implication du H₂O₂ produit par les NADPH oxydases sur la régulation du métabolisme de la proline chez la plante modèle pour l'étude des halophytes, *Thellungiella salsuginea*. En effet, Dans notre équipe, il a été démontré l'implication des PLCs et PLDs dans la régulation du métabolisme de la proline

chez *Arabis thaliana* (Thierry et al., 2004; Parre et al., 2007) et *Thellungiella salsuginea*, mais d'une façon opposée (Ghars et al., 2008; 2012). La tolérance remarquable de *T. salsuginea* aux contraintes et la forte accumulation de proline observée chez cette plante peut être partiellement expliquée par cette régulation opposée des voies de signalisation par rapport à la glycophyte *A. thaliana*. Une meilleure connaissance de ces voies de signalisation à travers notamment la régulation du métabolisme de la proline dans ces deux organismes modèles permettrait de mieux comprendre les différentes capacités d'adaptation des plantes aux contraintes environnementales.

RÉFÉRENCES

REFERENCE

- Abraham E., Rigo G., Szekely G., Nagy R., Koncz C., Szabados L., Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 2003, 51, 363-372.
- Aggarwal M., Sharma S., Kaur N., Patahnia D., Bhandhari K., Kaushal N., Kaur R., Singh K.J., Srivasatava A., Nayyar H. (2011) Exogenous proline application reduces phytotoxic effects of selenium by minimising oxidative stress and improves growth in bean (*Phaseolus vulgaris*L.) seedlings. *Biological Trace Element Research*, **140**, 354-367.
- Ahmad P, Jaleel CA, Salem MA, Nabi G, Sharma S. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit Rev Biotechnol* 2010; 3: 161-75.
- Ali Q., Ashraf M., Athar H.U.R., Exogenously applied proline at different growth stages enhances growth of two maize cultivars grown under water deficit conditions. *Pak J Bot*, 2007, 39, 1133-1144.
- Ali Q., Ashraf M., Shahbaz M., Humera H., Ameliorating effect of foliar applied proline on nutrient uptake in water stressed maize (*Zea mays* L.) plants. *Pak J Bot*, 2008, 40, 211-9.
- Alia M.P., Matysik J., Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acids*, 2001, 21, 195-200.
- Alia P.S.P., Mohanty P., Matysik J. (2001) Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acids* 21, 195-200.
- Alia P.S.P., Pardha S.P., Mohanty P. (1991) Proline enhances primary photochemical activities in isolated thylakoid membranes of *Brassica juncea* by arresting photoinhibitory damage. *Biochemical Biophysical Research Communication*, **181**, 1238-1244.
- Alves A.A.G., Setter T.L. (2004) Abscisic acid accumulation and osmotic adjustment in cassava under water deficit. *Environmental and Experimental Botany*, **51**, 259-279.
- Ashraf M., Foolad M.R. (2007) Roles of glycinebetaine and proline in improving plant abiotic stress tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, **59**, 206-216.
- Atkinson N.J., Urwin P.E. (2012) The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J. Exp. Bot.* 63, 3523-3543.
- Bailly C., Benamar A., Corbineau F., Côme D. (1996) Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated ageing. *Physiologia Plantarum*, **97**, 104-110.
- Banu M.N.A., Hoque M.A., Watanabe-Sugimoto M., Matsuoka K., Nakamura Y., Shimoishi Y., et al. (2009) Proline and glycine betaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. *J. Plant. Physiol.* 166,146–56.
- Bartoli CG, Casalongue C, Simontacchi M, Márquez-García B, Foyer CH. 2012. Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. *Environmental and Experimental Botany*, in press <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.05.003>.
- Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, **39**, 205-207.
- Beadle C.L. (1993) Growth analysis. In : Hall D.O., Scurloc J.M.O., Bolhar-

- Nordentrampf H.R., Leegod R.C., Long S.P. (Eds), Photosynthesis and production in a changing environment. Chapman Hall, London: 36-45.
- Bechtold U, Richard O, Zamboni A, Gapper C, Geisler M, Pogson B, Karpinski S, Mullineaux P. Impact of chloroplastic- and extracellular-sourced ROS on high light-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 2008; 59: 121–33.
- Ben Ahmed C., Ben Rouina B., Sensoy S., Boukhriss M., Ben Abdullah F. (2010) Exogenous proline effects on photosynthetic performance and antioxidant defense system of young olive tree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 4216-4222.
- Ben Amor N., Ben Hamed K., Debez A., Grignon C., Abdelly C. (2005) Physiological and antioxidant responses of the perennial halophyte *Crithmum maritimum* to salinity. *Plant Science*, **168**, 889-899.
- Ben Rejeb K., Abdelly C., Savouré A. (2012) Proline, a multifunctional amino-acid involved in plant adaptation to environmental constraints. *Biologie Aujourd'hui*, **206**, 291-299.
- Benzarti M., Ben Rejeb K., Debez A., Messedi D., Abdelly C. (2012) Photosynthetic activity and leaf antioxidative responses of *Atriplex portulacoides* subjected to extreme salinity. *Acta Physiologia Plantarum*, **34**, 1679-1688.
- Bestwick CS, Brown IR, Bennett MH, Mansfield JW. 1997. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Cell* **9**: 209-221.
- Blokhina OB, Chirkova TV, Fagerstedt KV. 2001. Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1-12.
- Borsani O., Zhu J., Verslues P.E., Sunkar R., Zhu J-K. (2005) Endogenous siRNAs derived from a pair of natural *cis*-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell*. 123, 1279-1291.
- Brugiere N., Dubois F., Limami A.M., Lelandais M., Roux Y., Sangwan R.S., Hirel B. (1999) Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production. *Plant Cell*, **11**, 1995-2012.
- Cecchini M.N., Monteoliva I.M., Marya E.A., Proline dehydrogenase contributes to pathogen defense in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2011, 155, 1947-1959.
- Chadalavada S., B Rajendrakumar., Reddy V., Reddy A., Proline-protein interactions: protection of structural and functional integrity of M4 lactate dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 201, 957-963.
- Chaouch S, Queval G, Noctor G. AtRbohF is a crucial modulator of defence-associated metabolism and a key actor in the interplay between intracellular oxidative stress and pathogenesis responses in *Arabidopsis*. *Plant J* 2012; 69: 613-27.
- Chen C., Dickman M.B. (2005) Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3459-3464.
- Chen H, Jiang JG. 2010. Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Dossiers environnement* **18**: 309-319.
- Chen J., Zhang Y., Wang C., Lü W., Jin J.B., Hua X. (2011) Proline induces calcium-mediated oxidative burst and salicylic acid signaling. *Amino Acids* 40, 1473-1484.
- Choudhury S, Panda P, Sahoo L, Panda SK. Reactive oxygen species signalling in plants under abiotic stress. *Plant Signal Behav* 2013; 8 e23681.

- Chung J.S., Zhu J.K., Bressan R.A., Hasegawa P.M., Shi H. (2008) Reactive oxygen species mediate Na⁺-induced *SOS1* mRNA stability in *Arabidopsis*. *Plant J.* 53, 554-65.
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**: 779–795.
- Dat JF, Lopez-Delgado H, Foyer CH, Scott IM. Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol* 1998; 116: 1351-7.
- Davletova S, Rizhsky L, Liang H, Shengqiang Z, Oliver DJ, Coutu J, Shulaev V, Schlauch K, Mittler R. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2005; 17: 268-81.
- de Campos M.K.F., de Carvalho K., de Souza F.S., Marur C.J., Pereira L.F.P., Filho J.C.B., Vieira L.G.E. (2011) Drought tolerance and antioxidant enzymatic activity in transgenic 'Swingle' citrumelo plants over-accumulating proline. *Environ. Exp. Bot.* 72, 242-250.
- de Carvalho K., de Campos M.K.F, Domingues D.S., Pereira L.F.P., Vieira L.G.E. (2013) The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic Swingle citrumelo. *Mol. Biol. Rep.* 40, 3269-3279.
- del Río L.A., Sandalio L.M., Corpas F.J., Palma J.M., Barroso J.B. (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol.* 141, 330–335.
- Delfine S., Alvino A., Zacchini M., Loreto F. (1998) Consequences of salt stress on conductance to CO₂ diffusion, Rubisco characteristics and anatomy of spinach leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*, **25**, 395-402.
- Deuschle K., Funck D., Forlani G., Stransky H., Biehl A., Leister D., van der Graaff E., Kunze R., Frommer W.B. (2004) The role of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. *Plant Cell*, **16**, 3413-3425.
- Di Martino C., Pizzuto R., Pallotta M.L., De Santis A., Passarella S., Mitochondrial transport in proline catabolism in plants: the existence of two separate translocators in mitochondria isolated from durum wheat seedlings. *Planta*, 2006, 223, 1123-1133.
- Esterbauer H, Grill D. Seasonal variation of glutathione and glutathione reductase in needles of *Picea abies*. *Plant Physiol* 1978; 61: 119-21.
- Fabro G, Kovács I, Pavet V, Szabados L, Alvarez ME. 2004. Proline accumulation and *AtP5CS2* gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **17**: 343-350.
- Floyd R.A., Nagy I. (1984) Formation of long-lived hydroxyl free-radical adducts of proline and hydroxyproline in a Fenton reaction. *Biochim. Biophys. Acta.* 790, 94-97.
- Fluhr R. Reactive oxygen-generating NADPH oxidases in plants. In: del Río LA, A. Puppo, editors. *Reactive oxygen species in plant signalling*. Berlin: Springer-Verlag; 2009. p. 1-23.
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JDG, Davies JM, Dolan L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 2003; 422: 442-6.

- Foyer CH, Noctor G. 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants and Redox Signaling* **11**: 861-905.
- Foyer CH, Noctor G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol* 2011; 155: 2–18.
- Frugoli JA, Zhong HH, Nuccio ., McCourt P, McPeck M, Thomas T, McClung R. Catalase encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol* 1996; 112: 327-36.
- Funck D, Eckard S. Müller G . 2010. Non-redundant functions of two proline dehydrogenase isoforms in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* 10, 70 doi:10.1186/1471-2229-10-70
- Funck D., Stadelhofer B., Koch W. (2008) Ornithine-delta-aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. *BMC. Plant. Biol.* 17, 8-40.
- Gadallah I., Effects of proline and glycinebetaine on *Vicia faba* responses to salt stress. *Biol Plant*, 1999, 42, 249-257.
- Genty B, Briantais JM, Baker N. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 1989; 990: 87-92.
- Ghars M.A., Parre E., Debez A., Bordenave M., Richard L., Leport L., Bouchereau A., Savouré A., Abdelly C., Comparative salt tolerance analysis between *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*, with special emphasis on K⁺/Na⁺ selectivity and proline accumulation. *J Plant Physiol*, 2008b, 165, 588-599.
- Ghars M.A., Parre E., Leprince A.S., Bordenave M., Lefebvre D., Richard L., Abdelly C., Savouré A., Opposite lipid signalling pathways tightly control proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*. In Abdelly C., Ashraf M. (Ed.), *Biosaline Agriculture and salinity Tolerance in Plants*, 2008a, pp. 317-32.
- Ghars M.A., Richard L., Lefebvre-De Vos D., Leprince A-S., Parre E., Bordenave M., Abdelly C., Savouré A. (2012) Phospholipases C and D Modulate Proline Accumulation in *Thellungiella halophila/salsuginea* Differently According to the Severity of Salt or Hyperosmotic Stress. *Plant Cell. Physiol.* 53, 183–192.
- Giannopolitis C.N., Ries S.K. (1977) Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, **59**, 309-314.
- Giberti S., Funck D., Forlani G. (2014) Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase from *Arabidopsis thaliana*: stimulation or inhibition by chloride ions and feedback regulation by proline depend on whether NADPH or NADH acts as co-substrate. *New Phytol.* DOI: 10.1111/nph.12701.
- Gill S.S., Tuteja N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem.* 48, 909-930.
- Gupta DK, Inouhe M, Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Sandalio LM. Oxidative stress and arsenic toxicity: role of NADPH oxidases. *Chemosphere* 2013; 90: 1987-96.
- Hameed A., Hussain T., Gulzar S., Aziz I., Gul B., Khan M. A. (2012) Salt tolerance of a cash crop halophyte *Suaeda fruticosa*: biochemical responses to salt and exogenous chemical treatments. *Acta Physiologiae Plantarum*, **34**, 2331-2340.
- Hamilton E., Heckathorn S., Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by antioxidants and small heat shock proteins,

whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiol*, 2001, 126, 1266-1274.

Hanson J., Hanssen M., Wiese A., Hendriks M., Smeeckens S., The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of *ASPARAGINE SYNTHETASE1* and *PROLINE DEHYDROGENASE2*. *Plant J*, 2008, 53, 935-949.

Hao F.S, Zhang JG, Yu ZL, Chen J. Involvement of NADPH oxidase NtrbohD in the rapid production of H₂O₂ induced by ABA in cultured tobacco cell line BY-2. *Prog Natl Sci* 2008; 18: 267-71.

Hare P.D., Cress W.A., Van Staden J. (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ*. 21, 535-553.

Hare P.D., Cress W.A., van Staden J. (2002) Disruptive effects of exogenous proline on chloroplast and mitochondrial ultrastructure in *Arabidopsis* leaves. *South African Journal of Botany*, **68**, 393-396.

Hare P.D., Cress W.A., Van Staden J., The effects of exogenous proline and proline analogues on in vitro shoot organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regul*, 2001, 34, 203-207.

Hayashi F, Ichino T, Osanai R, Wada K. 2000. Oscillation and regulation of proline content by *P5CS* and *ProDH* gene expressions in the light/dark cycles in *Arabidopsis thaliana* L. *Plant and Cell Physiology* **41**: 1096-1101.

Hayashi F., Ichino T., Osanai R., Wada K. (2000) Oscillation and regulation of proline content by *P5CS* and *ProDH* gene expressions in the light/dark cycles in *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Cell Physiol*. 41, 1096-1101.

Hayat S., Hayat Q., Alyemeni M.N., Wani A.S., Pichtel J., Aqil A. (2012) Role of proline

under changing environment. *Plant Signaling & Behavior*, **7**, 1-11.

Hebbelmann I., Selinski J., Wehmeyer C., Goss T., Voss I., Mul P., Kangasjärvi S., Aro E-M., Oelze M-L., Dietz K-J., Nunes-Nesi A., Do P.T., Fernie A.R., Talla S.K., Raghavendra A.S., Linke V., Scheibe R. (2012) Multiple strategies to prevent oxidative stress in *Arabidopsis* plants lacking the malate valve enzyme NADP-malate dehydrogenase. *J. Exp. Bot.* 63, 1445-1459.

Hernandez JA, Del Rio LA, Sevilla F. Salt stress induced changes in superoxide dismutase isozymes in leaves and mesophyll protoplasts from *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *New Phytol* 1994; 126: 37-44.

Hernandez M, Fernandez-Garcia N, Diaz-Vivancos P, Olmos E. A different role for hydrogen peroxide and the antioxidative system under short and long salt stress in *Brassica oleracea* roots. *J Exp Bot* 2010; 61: 521-35.

Hewitt E.J. (1960) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Commonwealth Bureau of Horticulture. Tech Rep, **22**, 431-446.

Hong Z., Lakkineni K., Zhang Z., Verma D.P.S. (2000) Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol*. 122, 1129-1136.

Hoque M.A.O.E., Banu M.N.A., Nakamura Y., Shimoishi Y., Murata Y. (2007) Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than the betaine by increasing antioxidant enzyme activities. *J. Plant Physiol*. 164, 553-561.

Hoque M.A.O.E., Banu M.N.A., Nakamura Y., Shimoishi Y., Murata Y. (2007) Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than the betaine by increasing

antioxidant enzyme activities. *Journal of Plant Physiology*, **164**, 553-561.

Hossain M.A., Hasanuzzaman M., Fujita M. (2011) Coordinate induction of antioxidant defense and glyoxalase system by exogenous proline and glycinebetaine is correlated with salt tolerance in mung bean. *Front. Agric. China* **5**, 1–14.

Hu XL, Zhang AY, Zhang JH, Jiang MY. Absciscic acid is a key inducer of hydrogen peroxide production in leaves of maize plants exposed to water stress. *Plant Cell Physiol* **2006**; **47**: 1484-95.

Hua B., Guo W.Y. (2002) Effect of exogenous proline on SOD and POD activity of soybean callus under salt stress. *Acta Agric. Bor. Sin.* **17**, 37-40.

Jiang C, Belfield EJ, Mithani A, Visscher A, Ragoussis J, Mott R, Smith JAC, Harberd NP. (2012). ROS-mediated vascular homeostatic control of root-to-shoot soil Na delivery in *Arabidopsis*. *EMBO Journal* **31**: 4359.

Jiang MY, J Zhang H. Involvement of plasma membrane NADPH oxidase in absciscic acid- and water stress-induced antioxidant defence in leaves of maize seedlings. *Planta* **2002a**; **215**: 1022-30.

Jiang MY, Zhang JH. Water stress-induced absciscic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *J Exp Bot* **2002b**; **53**: 2401-10.

Kant S., Kant P., Raveh E., Barak S., Evidence that differential gene expression between the halophyte, *Thellungiella halophila*, and *Arabidopsis thaliana* is responsible for higher levels of the compatible osmolyte proline and tight control of Na⁺ uptake in *T. halophila*. *Plant Cell Environ*, **2006**, **29**, 1220-1234.

Karpinski S, Reynolds H, Karpinska B, Wingsle G, Creissen G, Mullineaux P. Systemic signalling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* **1999**; **284**: 654-7.

Kavi Kishor P.B., Hong Z., Miao G.H., Hu C.A.A., Verma D.P.S. (1995) Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*, **108**, 1387-1394.

Kaya C., Tuna A.L., Ashraf M., Altunlu H. (2007) Improved salt tolerance of melon (*Cucumis melo* L.) by the addition of proline and potassium nitrate. *Environmental and Experimental Botany*, **60**, 397-403.

Kiyosue T, Yoshida Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1996. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **8**: 1323-1335.

Kobayashi M, Ohura I, Kawakita K, Yokota N, Fujiwara M, Shimamoto K, Doke N, Yoshioka H. 2007. Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *The Plant Cell* **19**: 1065-1080.

Kocsy G., Laurie R., Szalai G., Szilágyi V., Simon-Sarkadi L., Galiba G., de Ronde J. A. (2005) Genetic manipulation of proline levels affects antioxidants in soybean subjected to simultaneous drought and heat stresses. *Physiol. Plant.* **124**, 227-235.

Krishnan N., Dickman M.B., Becker D.F. (2008) Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. *Free Radical Bio. Med.* **44**, 671-681.

Kwak JM, Mori I, Pei Z-M, Leonhardt N, Torres M.A, Dangl JL, Bloom R, Bodde S,

- Jones JDG, Schroeder JI. NADPH oxidase *AtRbohD* and *AtRbohF* genes function in ROS-dependent ABA signalling in *Arabidopsis*. *EMBO J* 2003; 22: 2623-33.
- Lawlor D.W. (2002) Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Ann. Bot.* 89, 871-885.
- Lei Y., Yin C., Ren J., Li C. (2007) Effect of osmotic stress and sodium nitroprusside pretreatment on proline metabolism of wheat seedlings. *Biol. Plant.* 51, 386-390.
- Leshem Y, Seri L, Levine A. 2007. Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *Plant Journal* **51**: 185-197.
- Li L, Yi H. Effect of sulfur dioxide on ROS production, gene expression and antioxidant enzyme activity in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol Biochem* 2012; 58: 46-53.
- Li Y, Liu Y, Zhang J. Advances in the research on the AsA-GSH cycle in horticultural crops. *Front Agric China* 2010; 4: 84-90.
- Lichtenthaler H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembrane. In: Douce R, Packer L. (Eds), *Methods in enzymology*, vol 148. Academic Press, San Diego: 350-382.
- Lichtenthaler H.K. (1996) Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Plant Physiol.* 148, 4-14.
- Liu J., Zhu J.K. (1997) Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **114**, 591-596.
- Ma L, Zhang H, Sun L, Jiao Y, Zhang G, Miao C, Hao F. (2012). NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* function in ROS-dependent regulation of Na⁺/K⁺ homeostasis in *Arabidopsis* under salt stress. *Journal of Experimental Botany* **63**: 305-317.
- Maksimovic JD, Zhang J, Zeng F, Ziivanovic BD., Shabala L, Zhou M, Shabala S. Linking oxidative and salinity stress tolerance in barley: can root antioxidant enzyme activity be used as a measure of stress tolerance? *Plant Soil* 2013; 365: 141-55.
- Martinez J.P., Lutts S., Schanck A., Bajji M., Kinet J.M. (2004) Is osmotic adjustment required for water-stress resistance in the Mediterranean shrub *Atriplex halimus*. *Journal of Plant Physiology*, **161**, 1041-1051.
- Maruta T, Inoue T, Tamoi M, Yabuta Y, Yoshimura K, Ishikawa T, Shigeoka S. (2011). *Arabidopsis* NADPH oxidases, *AtrbohD* and *AtrbohF*, are essential for jasmonic acid-induced expression of genes regulated by MYC2 transcription factor. *Plant Science* **180**: 655-660
- Matysik J., Alai B., Mohanty P. (2002) Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Curentr Science*, **82**, 525-532.
- Maxwell K., Johnson G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, **51**, 659-668.
- Megdiche W., Ben Amor N., Debez A., Hessini K., Ksouri R., Abdelly C. (2009) Physiological and biochemical traits involved in the genotypic variability to salt tolerance of Tunisian *Cakile maritima*. *African Journal of Ecology*, **47**, 774-783.
- Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, Shulaev V, Dangl JL, Mittler R. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signalling in response to diverse stimuli. *Sci Signal* 2009; 2: ra45.
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. (2011). Reactive oxygen species

homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell and Environment* **33**: 453-367.

Miller G., Honig A., Stein H., Suzuki N., Mittler R., Zilberstein A. (2009b) Unraveling delta1-pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. *J.Biol. Chem.* 284, 26482-26492.

Mishra S., Dubey R.S., Inhibition of ribonuclease and protease activities in arsenic-exposed rice seedlings: role of proline as enzyme protectant. *J Plant Physiol*, 2006, 163, 927-936.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 2004; 9: 490-98.

Mittler R, Zilinskas BA. Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *J Biol Chem* 1992; 267: 21802-7.

Molinari H.B.C., Marur C.J., Daros E., de Campos M.K.F., de Carvalho J.F.R.P et al. (2007). Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): Osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiol. Plant.* 130, 218-229.

Morita S, Kaminaka H, Masumura T, Tanaka K. Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress; the involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signalling. *Plant Cell Physiol* 1999; 40: 417-22.

Munns R., Tester M. (2008) Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, **59**, 651-681.

Mylona PV, Polidoros AN. ROS regulation of antioxidant genes. In: Gupta SD, editors. *Reactive oxygen species and antioxidants in*

higher plants. USA: Science Publishers; 2010. p. 101-127.

Nakano Y., Asada K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, **22**, 867-880.

Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K. 2009. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiology* **149**: 88-89.

Nam MH, Huh SM, Kim KM, Park WJ, Seo JB, Cho K, Kim DY, Kim BG, Yoon IS. Comparative proteomic analysis of early salt stress-responsive proteins in roots of SnRK2 transgenic rice. *Proteome Sci* 2012; 10: 25.

Nanjo T., Kobayashi M., Yoshiba Y., Sanada Y., Wada K., Tsukaya H., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1999) Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **18**, 185-193.

Ogasawara Y, Kaya H, Hiraoka G, et al. 2008. Synergistic activation of the *Arabidopsis* NADPH oxidase AtrbohD by Ca^{2+} and phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 8885-8892.

Okuma E., Murakami Y., Shimoishi Y., Tada M., Murata Y. (2004) Effects of exogenous application of proline and betaine on the growth of tobacco cultured cells under saline conditions. *Soil Science and Plant Nutrition*, **50**, 1301-1305.

Oracz K, El-Maarouf-Bouteau H, Kranner I, Bogatek R, Corbineau F, Bailly C. The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signalling during germination. *Plant Physiol* 2009; 150: 494-505.

- Ozden M., Demirel U., Kahraman A. (2009) Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂. *Sci. Hort.-Amsterdam*. 119, 163-168.
- Parre E, Ghars MA, Leprince A-S, Thiery L, Lefebvre D, Bordenave M, Luc R, Mazars C, Abdelly C, Savouré A. Calcium signalling via phospholipase C is essential for proline accumulation upon ionic but not nonionic hyperosmotic stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2007; 144: 503-12.
- Pastori G.M., Foyer C.H. (2002) Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress: the central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol*. 129, 460-468.
- Pellinen R, Palva T, Kangasjärvi J. 1999. Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *Plant Journal* **20**: 349.356.
- Peng Z., Lu Q., Verma D. P., Reciprocal regulation of delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Mol Gen Genet*, 1996, 253, 334-41.
- Petrov V.D., Van Bresegem F. (2012) Hydrogen peroxide-a central hub for information flow in plant cells. *AoB Plants* pls014; doi:10.1093/aobpla/pls014.
- Phang J. M., Liu W. (2012) Proline metabolism and cancer. *Front. Biosci.* 17, 1835-1845.
- Phang J.M. (1985) The regulatory functions of proline and pyrroline-5-carboxylic acid. *Curr. Top. Cell. Regul.* 25, 91-132.
- Pnueli L, Hongjian L, Mittler R. Growth suppression, abnormal guard cell response, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx1)-deficient *Arabidopsis* plants. *Plant J* 2003; 34: 187-203.
- Pogany M, von Rad U, Grun S, Dongo A, Pintye A, Simoneau P, Bahnweg G, Kiss L, Barna B, Durner J. 2009. Dual roles of reactive oxygen species and NADPH oxidase RBOHD in an *Arabidopsis-Alternaria pathosystem*. *Plant Physiology* **151**: 1459-1475.
- Prasad TK, Anderson MD, Stewart CR. Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. *Plant Physiol* 1994; 105: 619-27.
- Rizhsky L, Davletova S, Liang H, Mittler R. The zinc-finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 2004; 279: 11736-43.
- Rizhsky L., Hallak-Herr E., Van Breusegem F., Rachmilevitch S., Rodermeil S., Inze D., Mittler R. (2002) Double antisense plants with suppressed expression of ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants with suppressed expression of ascorbate peroxidase or catalase. *Plant Journal*, **32**, 329-342.
- Romero-Puertas, MC, McCarthy I, sandalio LM, Palma JM, Corpas FJ, Gomez M, Del Rio LA. (1999). Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaves peroxisomes. *Free Radical Research* **31**: 25-31.
- Saidi Y, Finka A, Goloubinoff P. Heat perception and signalling in plants: a tortuous path to thermotolerance. *New Phytol* 2011; 190: 556-65.
- Santos M, Gousseau H, Lister C, Foyer C, Creissen G, Mullineaux P. Cytosolic ascorbate peroxidase from *Arabidopsis thaliana* L. is encoded by a small multigene family. *Planta* 1996; 198: 64-9.

- Satoh R., Fujita Y., Nakashima K., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.Y., A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45, 309-317.
- Satoh R., Nakashima K., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., ACTCAT, a novel *cis*-acting element for proline- and hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene encoding proline dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2002, 130, 709-719.
- Savouré A, Hua XJ, Bertauche N, Van Montagu M, Verbruggen N. 1997. Absciscic acid-independent and absciscic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics* **254**, 104-109.
- Savouré A, Jaoua S, Hua XJ, Ardiles W, Van Montagu M, Verbruggen N. 1995. Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the DELTA-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **372**: 13-19.
- Scandalios JG. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol* 1993; 101:7-12.
- Schobert B., Tschesche H. (1978) Unusual properties of proline and its interaction with proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **541**, 270-277.
- Senthil-Kumar M., Mysore K.S. (2012) Ornithine-delta-aminotransferase and proline dehydrogenase genes play a role in non-host disease resistance by regulating pyrroline-5-carboxylate metabolism-induced hypersensitive response. *Plant Cell. Environ.* **35**, 1329-1343.
- Servet C, Ghelis T, Richard L, Zilberstein A, Saviouré A. 2012. Proline dehydrogenase: a key enzyme in controlling cellular homeostasis. *Frontiers in Bioscience* **17**: 607-620.
- Shaddad MA. (1990) The effect of proline application on the physiology of *Raphanus sativus* plants grown under salinity stress. *Biologia Plantarum*, **32**, 104-112.
- Sharma S, Verslues PE. 2010. Mechanisms independent of ABA or proline feedback have a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery. *Plant Cell and Environment* **33**: 1838-1851.
- Sharma S, Villamor JG, Verslues PE. 2011. Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant Physiology* **157**: 292-304.
- Sharma S.S., Schat H., Vooijs R., In vitro alleviation of heavy metal-induced enzyme inhibition by proline. *Phytochemistry*, 1998, 49: 1531-5.
- Shetty K. (2004) Role of proline-linked pentose phosphate pathway in biosynthesis of plant phenolics for functional food and environmental applications: A review. *Process Biochem.* **39**, 789-803.
- Signorelli S., Arellano J.B., Melø T.B., Borsani O., Monza J. (2013a) Proline does not quench singlet oxygen: evidence to reconsider its protective role in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **64**, 80-83.
- Signorelli S., Casaretto E., Sainz M., Díaz P., Monza J., Borsani O. (2013b) Antioxidant and photosystem II responses contribute to explain the drought-heat contrasting tolerance of two forage legumes. *Plant Physiology and Biochemistry*, **70**, 195-203.

- Signorelli S., Coitiño E. L., Borsani O., Monza J. (2014) Molecular mechanisms for the reaction between $\cdot\text{OH}$ radicals and proline: insights on the role as reactive oxygen species scavenger in plant stress. *J. Phys. Chem. B.* 118, 37–47.
- Siripornadulsil S., Traina S., Verma D.P.S., Sayre R.T. (2002) Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell.* 14, 2837-2847.
- Skopelitis D.S., Paranychianakis N.V., Paschalidis K.A., Pliakonis E.D., Delis I.D., Yakoumakis, D.I., Kouvarakis A., Papadakis A.K., Stephanou E.G., Roubelakis-Angelakis K.A. (2006). Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *Plant Cell.* 18, 2767-2781.
- Slama I., Messedi D., Ghnaya T., Savouré A., Abdelly C. (2006) Effects of water-deficit on growth and proline metabolism in *Sesuvium portulacastrum*. *Environmental and Experimental Botany*, **56**, 231-238.
- Smirnoff N., Cumbes Q.J. (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*. 28, 1057-1060.
- Solomon A., Beer S., Waisel Y., Paleg L.G. (1994) Effects of NaCl on the carboxylating activity of Rubisco from *Tamarix jordanis* in the presence of proline-related compatible solutes. *Physiologia Plantarum*, **90**, 198-204.
- Sorkheh K., Shiran B., M Khodambashi., Rouhi V., Mosavei S., Sofo A. (2012) Exogenous proline alleviates the effects of H_2O_2 induced oxidative stress in wild Almond species. *Russian Journal of Plant Physiology*, **59**, 788-798.
- Strizhov N, Abraham E, Okresz L, Blickling S, Zilberstein A, Schell J, Koncz C, Szabados L. 1997. Differential expression of two *P5CS* genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **12**: 557-569.
- Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R., Miller G. (2012) ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ.* 35, 259-70.
- Szabados L, Savouré A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Science* **15**: 89-97.
- Székely G, Abraham E, Cselo A, Rigo G, Zsigmond L, Csiszar J, Ayaydin F, Strizhov N, Jasik J, Schmelzer E, Koncz C, Szabados L. 2008. Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant Journal* **53**: 11-28.
- Tan J., Zhao H., Hong J., Han Y., Li H., Zhao W. (2008) Effects of exogenous nitric oxide on photosynthesis, antioxidant capacity and proline accumulation in wheat seedlings subjected to osmotic stress. *World J. Agric. Sci.* 4, 307-313.
- Thiery L, Leprince A-S, Lefebvre D, Ghars MA, Debarbieux E, Savouré A. 2004. Phospholipase D is a negative regulator of proline biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 14812-14818.
- Torres MA, Dangl JL, Jones JDG. 2002. *Arabidopsis* gp91^{phox} homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**: 517-522.
- Tsai YC, Hong CY, Liu LF, Kao CH. Expression of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in response to NaCl and H_2O_2 in roots of rice seedlings. *J Plant Physiol* 2005; 162: 291-9.

- Verbruggen N, Hua XJ, May M, Van Montagu M. 1996. Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: evidence for a negative transcriptional regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**: 8787–8791
- Verslues P.E., Sharma S., Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *Arabidopsis Book*, 2010, 8,e0140.
- Verslues P.E., Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Zhu J., Zhu J.-K., Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J*, 2006, 45, 523-539.
- Verslues P.E., Kim Y.S., Zhu J.K. (2007) Altered ABA, proline and hydrogen peroxide in an *Arabidopsis* glutamate:glyoxylate aminotransferase mutant. *Plant Mol. Biol.* 64, 205-217.
- Verslues P.E., Sharma S. (2010) Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *Arabidopsis Book*. 8, e0140.
- Wen J.F., Gong M., Liu Y., Hu J.L., Deng M.h. (2013) Effect of hydrogen peroxide on growth and activity of some enzymes involved in proline metabolism of sweet corn seedlings under copper stress. *Sci. Hortic.* 164, 366–371.
- Werner J.E., Finkelstein R.R. (1995) *Arabidopsis* mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. *Physiologia Plantarum*, **93**, 659-666.
- Wi S.J., Ji NR, Park KY. Synergistic biosynthesis of biphasic ethylene and reactive oxygen species in response to hemibiotrophic *Phytophthora parasitica* in tobacco plants. *Plant Physiol* 2012; 159: 251-65.
- Wu J, Wang L, Wünsche H, Baldwin IT. Narboh D, a respiratory burst oxidase homolog in *Nicotiana attenuata*, is required for late defence responses after herbivore attack. *J Integr Plant Biol* 2013; 55:187-198.
- Xie Y.J., Xu S., Han B., Wu M.Z., Yuan X.X., Han Y., Gu Q., Xu D.K., Yang Q., Shen W.B. (2011) Evidence of Arabidopsis salt acclimation induced by up-regulation of HY1 and the regulatory role of RbohD-derived reactive oxygen species synthesis. *Plant J.* 66, 280-292.
- Xing Y, Jia W, Zhang J. AtMEK1 mediates stress-induced gene expression of CAT1 catalase by triggering H₂O₂ production in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 2007; 58: 2969-81.
- Xu J.,Yin H.X., Li X. (2009) Protective effects of proline against cadmium toxicity in micropropagated hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. *Plant Cell Rep.* 28, 325–33.
- Xu S, Ding H, Su F, Zhang A, Jiang M. Involvement of protein phosphorylation in water stress-induced antioxidant defence in maize leaves. *J Integr Plant Biol* 2009; 51: 654-62.
- Yamada M., Morishita H., Urano K., Shiozaki N., Kazuko Y.S., Shinozaki K., Yoshida, Y., Effects of proline accumulation in petunias under drought stress. *J Expt Bot*, 2005, 56, 1975-1981.
- Yan Z., Guo S., Shu S., Sun J., Tezuka T. (2011) Effects of proline on photosynthesis, root reactive oxygen species (ROS) metabolism in two melon cultivars (*Cucumis melo* L.) under NaCl stress. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 18381-18390.
- Yang S.L., Lan S.S., Gong M. (2009) Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. *J. Plant Physiol.* 166, 1694-1699.
- Yang Y.L., Zhang Y.Y., Lu J., Zhang H., Liu Y., Jiang Y., Shi R.X. (2012) Exogenous

H₂O₂ increased catalase and peroxidase activities and proline content in *Nitraria tangutorum* callus. *Biol. Plant.* 56, 330-336.

Yoshida Y, Kiyosue T, Katagiri T, Ueda H, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Wada K, Harada Y, Shinozaki K. (1995). Correlation between the induction of a gene for delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant Journal* 7: 751-760.

Zarse K., Schmeisser S., Groth M., Priebe S., Beuster G., Kuhlow D., Guthke R., Platzer M., Kahn C.R., Ristow M. (2012) Impaired insulin/IGF1 signaling extends life span by promoting mitochondrial L-proline catabolism to induce a transient ROS signal. *Cell Metab.* 15, 451-465.

Zhang A, Jiang M, Zhang J, Ding H, Xu S, Hu X, Tan M. Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defence in maize leaves. *New Phytol* 2007; 175: 36-50.

Zhang A, Jiang M, Zhang J, Tan M, Hu X. Mitogen-activated protein kinase is involved in abscisic acid-induced antioxidant defence and acts downstream of reactive oxygen species production in leaves of maize plants. *Plant Physiol* 2006; 141: 475-87.

Zhang C.S., Lu Q., Verma D.P.S., Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme

catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *J Biol Chem*, 1995, 270, 20491-20496.

Zhang L.P., Mehta S.K., Liu Z.P., Yang Z.M. (2008) Copper-induced proline synthesis is associated with nitric oxide generation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* 49, 411-419.

Zhang Y, Zhu H, Zhang Q, Li M, Yan M, Wang R, Wang L, Welti R, Zhang W, Wang X. 2009. Phospholipase D{alpha}1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 2357-2377.

Zhao M.G., Chen L., Zhang L.L., Zhang W.H. (2009) Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 151, 755-767.

Zhao Q., Yu D., Chang H., Guo X., Yuan C., Hu S., Zhang C., Wang P., Wang Y. (2013) Regulation and function of *Arabidopsis AtGALK2* gene in abscisic acid response signaling. *Molecular Biology Reports* DOI 10.1007/s11033-013-2773-2.

Zhou J, Xia X-J, Zhou Y-H, Kai S, Chen Z, Yu J-Q. RBOH1 -dependent H₂O₂ production and subsequent activation of MPK1/2 play an important role in acclimation-induced cross-tolerance in tomato. *J Exp Bot* 2014; 65: 595-607.

Zhu JK. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci* 2001; 6: 66-7

Résumé

La caractérisation physiologique et biochimique de la réponse au sel d'un mutant d'*Arabidopsis thaliana* déficient dans la synthèse de la proline (*p5cs1-4*) a montré que: (i) l'apport de sel dans le milieu de culture réduit de manière significative l'activité de croissance chez les deux génotypes et de façon plus marquée chez le mutant *p5cs1-4*. Cette restriction de la croissance est concomitante à une diminution significative de l'activité photosynthétique, de la fluorescence chlorophyllienne et du contenu des feuilles en chlorophylles, (ii) la salinité du milieu affecte de la même manière les relations hydriques et l'homéostasie ionique chez les deux génotypes, (iii) le mutant *p5cs1-4* montre des niveaux particulièrement élevés en ERO en lien avec une faible activité des enzymes antioxydantes sous contrainte saline, et (iv) la pulvérisation foliaire de proline sous contrainte saline améliore la capacité antioxydante chez le mutant *p5cs1-4* et rétablit sa croissance ainsi que son activité photosynthétique. L'analyse des relations entre la production précoce de H_2O_2 par la NADPH oxydase et la défense antioxydante chez *A. thaliana* soumise à la salinité a montré que (i) l'exposition des plantes sauvages d'*A. thaliana* à 200 mM NaCl pendant 24 h conduit à une accumulation transitoire de H_2O_2 , suivie d'une augmentation significative des activités des enzymes Catalases, Ascorbate peroxydases et Glutathione reductases, (ii) en présence de sel, le prétraitement des plantes par le DMTU, un chélateur de H_2O_2 , ou le DPI et l'imidazole, deux inhibiteurs des NADPH oxydases, conduit à de faibles activités des enzymes antioxydantes, (iii) le double mutant affiche également des activités faibles de ses enzymes antioxydantes, (iv) l'effet à long terme du sel (100 mM pendant 7 jours) a démontré une meilleure performance des plantes sauvages par rapport aux mutantes se traduisant par une meilleure aptitude à maintenir une activité photosynthétique, une absorption sélective de K^+ et une protection des tissus contre le stress oxydatif. D'autre part, nous avons pu démontrer que le H_2O_2 est impliquée dans l'accumulation de la proline car (i) l'accumulation de la proline est précédée par des niveaux particulièrement élevés de H_2O_2 et (ii) l'utilisation de piègeurs de H_2O_2 (DMTU) supprime l'accumulation de la proline chez les plantes soumises aux contraintes osmotiques. Les résultats ont montré également que la NADPH oxydase est la source potentielle de H_2O_2 . En effet, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de cette enzyme, le DPI, ainsi que des mutants knock-out conduisent également à une inhibition de l'activité de l'enzyme-clé de la synthèse de la proline. Nos résultats démontrent l'implication des ERO et notamment du H_2O_2 dans la régulation de l'accumulation de la proline en réponse à des contraintes osmotiques.

Abstract

Physiological and biochemical characterization of salt stress response in *Arabidopsis thaliana* *p5cs1-4* mutant defective in proline biosynthesis showed that: (i) the presence of salt in the culture medium significantly reduced growth of both genotypes, particularly in the *p5cs1-4* mutant. The growth restriction is linked to a significant decrease in photosynthesis, chlorophyll fluorescence and leaf chlorophyll content, (ii) no significant difference was observed in the leaf water status and Na^+/K^+ ratio between salt-treated wild-type and *p5cs1-4* seedlings, suggesting that the salt hypersensitivity of the mutant was not due to the disruption of water uptake or Na^+/K^+ homeostasis. Under salt stress, the *p5cs1-4* mutant showed high levels of ROS and lower activity of antioxidant enzymes. Foliar application of proline under salt stress increased the antioxidant activity in the *p5cs1-4* mutant and restored its photosynthetic activity. The analysis of the relationship between the early production of H_2O_2 by the NADPH oxidase (AtRboh) and the antioxidant defense in wild-type *A. thaliana* subjected to salinity showed that (i) short-term salt exposure led to a transient and significant increase of H_2O_2 concentration, followed by a marked increase in Catalase, Ascorbate peroxidase and Glutathione reductase activities, (ii) pre-treatment with either dimethylthiourea (DMTU), a chemical trap for H_2O_2 , or two NADPH oxidase inhibitors such as imidazole and diphenylene iodonium (DPI), significantly decreased the above-mentioned enzyme activities under salinity. *atrbohdf* double mutant plants failed to induce the antioxidant response under the culture conditions, (iii) under long-term salinity, the wild-type was more salt-tolerant than the mutant based on the plant biomass production. The better performance of the wild-type was related to a significantly higher photosynthetic activity, a more efficient K^+ selective uptake, and to the plant ability to deal with the salt-induced oxidative stress as compared to *atrbohdf*. In addition NaCl or mannitol stress resulted in a transient increase in H_2O_2 content followed by an accumulation of proline upon stress. In contrast DMTU and DPI were found to significantly inhibit proline accumulation. Expression level of the key enzyme involved in the biosynthesis of proline was observed to be diminished by DPI and in *atrboh* mutants. Our results demonstrated that ROS and in particular H_2O_2 are involved in the accumulation of proline in *A. thaliana* upon osmotic stress.